

بِسْمِ اللَّهِ الرَّحْمَنِ الرَّحِيمِ



معاونت پژوهش و فن آوری

به نام خدا

منشور اخلاق پژوهش

بیایم از خداوند سبحان و اعتقاد به این که عالم محضر خداست و همواره ناظر بر اعمال انسان و به منظور پاس داشت مقام بلند دانش و پژوهش و نظریه ایست جایگاه دانشگاه در اعلامی فرهنگ و تمدن بشری، مادر انجمن و اعضاء بیست علمی واحد های دانشگاه آزاد اسلامی متعهد می گردیم اصول زیر را در انجام فعالیت های پژوهشی مد نظر قرار داده و از آن تخطی نکنیم:

۱- اصل حقیقت جویی: تلاش در راستای پی جویی حقیقت و وفاداری به آن و دوری از هرگونه پنهان سازی حقیقت.

۲- اصل رعایت حقوق: التزام به رعایت کامل حقوق پژوهشگران و پژوهشگران (انسان، حیوان و نبات) و سایر صاحبان حق.

۳- اصل مالکیت مادی و معنوی: تعهد به رعایت کامل حقوق مادی و معنوی دانشگاه و کلیه همکاران پژوهش.

۴- اصل منافع ملی: تعهد به رعایت مصالح ملی و در نظر داشتن پیشبرد و توسعه کشور در کلیه مراحل پژوهش.

۵- اصل رعایت انصاف و امانت: تعهد به اجتناب از هرگونه جانب داری غیر علمی و حفاظت از اموال، تجهیزات و منابع در اختیار.

۶- اصل رازداری: تعهد به صیانت از اسرار و اطلاعات محرمانه افراد، سازمان ها و کشور و کلیه افراد و نهاد های مرتبط با تحقیق.

۷- اصل احترام: تعهد به رعایت حریم ها و حرمت ها در انجام تحقیقات و رعایت جانب تعدد و خودداری از هرگونه حرمت شکنی.

۸- اصل ترویج: تعهد به رواج دانش و اشاعه نتایج تحقیقات و انتقال آن به همکاران علمی و دانشجویان به غیر از مواردی که منع قانونی دارد.

۹- اصل برائت: التزام به برائت جویی از هرگونه رفتار غیر حرفه ای و اعلام موضع نسبت به کسانی که حوزه علم و پژوهش را به شبهه های غیر علمی می آلودند.



دانشگاه آزاد اسلامی

واحد علوم و تحقیقات

تعهد نامه اصالت رساله

اینجانب ارغوان میار عباس کیانی دانش آموخته مقطع دکترای تخصصی در رشته شیلات که در تاریخ ۹۱/۱۱/۲۸ از رساله خود تحت عنوان اثرات تلفیقی ویتامین های E و C بر فاکتورهای زیستی، شاخص های خونی و مقاومت در برابر استرس درجه حرارت در ماهی قزل آلائی رنگین کمان با کسب نمره ۱۸،۲۵ و درجه دفاع نموده ام بدینوسیله متعهد می شوم :

(۱) این رساله حاصل تحقیق و پژوهش انجام شده توسط اینجانب بوده و در مواردی که از دستاوردهای علمی و پژوهشی دیگران (اعم از پایان نامه ، کتاب ، مقاله و ...) استفاده نموده ام، مطابق ضوابط و رویه موجود ، نام منبع مورد استفاده و سایر مشخصات آن را در فهرست مربوط ذکر و درج کرده ام.

(۲) این رساله قبلاً برای دریافت هیچ مدرک تحصیلی (هم سطح ، پایین تر یا بالاتر) در سایر دانشگاه ها و موسسات آموزش عالی ارائه نشده است.

(۳) چنانچه بعد از فراغت از تحصیل، قصد استفاده و هر گونه بهره برداری اعم از چاپ کتاب، ثبت اختراع و از این پایان نامه داشته باشم، از حوزه معاونت پژوهشی واحد مجوزهای مربوطه را اخذ نمایم.

(۴) چنانچه در هر مقطع زمانی خلاف موارد فوق ثابت شود، عواقب ناشی از آن را می پذیرم و واحد دانشگاهی مجاز است با اینجانب مطابق ضوابط و مقررات رفتار نموده و در صورت ابطال مدرک تحصیلی ام هیچ گونه ادعایی نخواهم داشت.

نام و نام خانوادگی :

ارغوان میار عباس کیانی

۹۱/۱۱/۲۸



دانشگاه آزاد اسلامی
واحد علوم و تحقیقات
دانشکده کشاورزی و منابع طبیعی، گروه شیلات

رساله دکتری رشته شیلات (Ph.D)

عنوان :

اثرات تلفیقی ویتامین های E و C بر فاکتورهای زیستی، شاخص های خونی و مقاومت
در برابر استرس درجه حرارت در ماهی قزل آلاي رنگين کمان
(*Onchorhyncus mykiss*)

استادان راهنما:

دکتر عباس متین فر

دکتر مهدی شمسایی

استاد مشاور:

دکتر مهدی سلطانی

نگارش :

ارغوان میار عباس کیانی

زمستان ۹۱

سپاسگزاری :

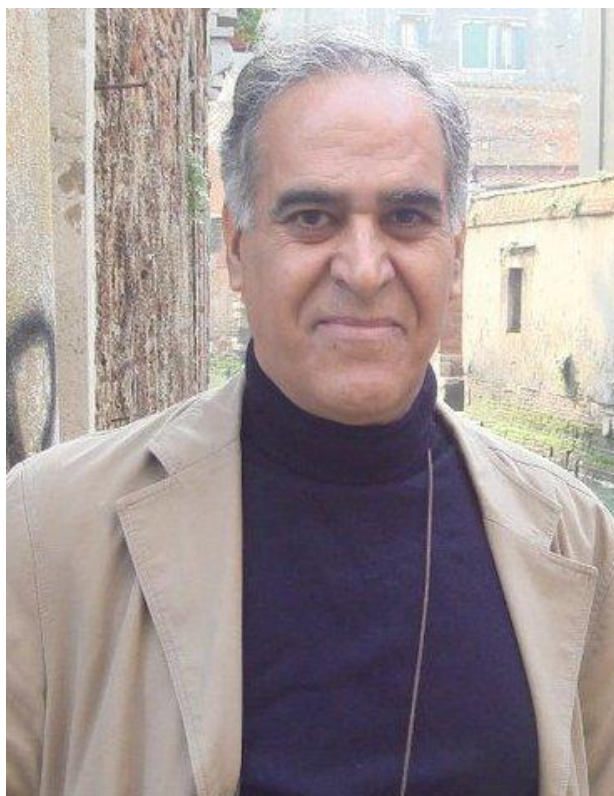
سپاس فراوان از اساتید ارجمند و دانشمند ، جناب آقای دکتر عباس متین فر و جناب آقای دکتر مهدی شمسایی که به عنوان اساتید راهنمای این تحقیق در تمامی مراحل در کنارم حضور داشته و افتخار شاگردی خود را نصیب بنده نمودند. مراتب قدردانی و سپاس خود را به استاد ارجمند جناب آقای دکتر مهدی سلطانی، مدیر گروه محترم گروه شیلات ابراز می دارم که به عنوان استاد مشاور از علم و دانش ایشان بهره مند بودم. با تشکر فراوان از دایی عزیزم مهندس مهدی میار که امکانات لازم برای اجرای این تحقیق را در اختیار من گذاشتند و همواره در کنارم حضور داشتند. لازم می دانم از محبت ، همراهی و یاری بی دریغ دوستان عزیز و مهربانم جناب آقای مهندس شروین میار و سرکار خانم دکتر سلطنت نجار لشکری تشکر و قدردانی نمایم .سپاس فراوان از پدر و مادر مهربانم که همواره یار و یاور من بودند و همواره حضور سبزشان موجب دلگرمی من است.

تقدیم به :

یاد و خاطره استاد دانشمند و فرزانه ، دکتر بهیار جلالی جعفری

آنکه عاشقانه زیست و تا ابدیت خاطره اش پایدار خواهد ماند.

واژه ها قد نمی دهند ارتفاع دلتنگی ام را



فهرست مطالب

شماره صفحه

عنوان

چکیده

فصل اول : کلیات

۳	۱-۱- مقدمه
۴	۱-۱-۱- ویتامین C
۷	۱-۱-۲- ویتامین E
۷	۱-۱-۳- شاخص های خونی
۸	۱-۳-۱- گلبول های قرمز
۸	۱-۳-۲- گلبول های سفید
۹	۱-۴- استرس
۱۰	۲-۱- بیان مسئله تحقیق
۱۱	۳-۱- اهمیت و ضرورت انجام تحقیق
۱۱	۴-۱- اهداف تحقیق
۱۲	۵-۱- فرضیه های تحقیق
۱۳	فصل دوم : مروری بر ادبیات و مستندات و پیشینه تحقیق

فصل سوم : روش اجرای تحقیق

۲۳	۱-۳- محل انجام تحقیق
۲۴	۲-۳- غذا
۲۵	۳-۳- ویتامین E
۲۵	۴-۳- ویتامین C

۲۶ ۳-۵- تجزیه لاشه
۲۶ ۳-۵-۱- اندازه گیری درصد رطوبت
۲۶ ۳-۵-۲- اندازه گیری درصد چربی
۲۷ ۳-۵-۳- اندازه گیری درصد پروتئین
۲۷ ۳-۵-۴- اندازه گیری درصد خاکستر
۲۸ ۳-۶- آنالیز میزان ویتامین C در جیره های غذایی
۲۸ ۳-۷- بررسی های زیست سنجی
۲۸ ۳-۸- بررسی شاخص های خونی
۲۸ ۳-۸-۱- خونگیری
۲۹ ۳-۸-۲- شمارش گلبول های قرمز RBC
۲۹ ۳-۸-۳- شمارش گلبول های سفید WBC
۲۹ ۳-۸-۴- اندازه گیری هماتوکریت
۳۰ ۳-۸-۵- شمارش افتراقی گلبول های سفید
۳۱ ۳-۸-۶- اندازه گیری هموگلوبین
۳۱ ۳-۸-۷- تهیه سرم خون
۳۱ ۳-۹- اندازه گیری کورتیزول
۳۲ ۳-۱۰- اندازه گیری گلوکز
۳۲ ۳-۱۱- بررسی درصد بقاء بچه ماهیان قزل آلا
۳۲ ۳-۱۲- شاخص وضعیت
۳۲ ۳-۱۳- ضریب تبدیل غذایی
۳۳ ۳-۱۴- نسبت بازده پروتئین
۳۳ ۳-۱۵- نرخ رشد ویژه

۳۳ ۳-۱۶- افزایش وزن
۳۳ ۳-۱۷- درصد میانگین رشد روزانه
۳۴ ۳-۱۸- درصد کارایی تبدیل غذا
۳۴ ۳-۱۹- درصد افزایش وزن
۳۴ ۳-۲۰- درصد ضریب رشد روزانه
۳۴ ۳-۲۱- بررسی کیفی آب
۳۵ ۳-۲۲- تجزیه و تحلیل آماری
۳۶	فصل چهارم: تجزیه و تحلیل داده ها
۳۷ ۴-۱- درصد افزایش وزن
۳۸ ۴-۲- ضریب رشد ویژه
۳۸ ۴-۳- ضریب چاقی
۳۹ ۴-۴- نسبت بازده پروتئین
۴۰ ۴-۵- ضریب تبدیل غذایی
۴۱ ۴-۶- درصد کارایی تبدیل غذا
۴۱ ۴-۷- درصد میانگین رشد روزانه
۴۳ ۴-۸- درصد ضریب رشد روزانه
۴۳ ۴-۹- آنالیز فاکتور های شیمیایی آب
۴۴ ۴-۱۰- آنالیز لاشه
۴۴ ۴-۱۰-۱- درصد رطوبت لاشه
۴۴ ۴-۱۰-۲- درصد پروتئین لاشه
۴۵ ۴-۱۰-۳- درصد چربی لاشه
۴۶ ۴-۱۰-۴- خاکستر
۴۶ ۴-۱۱- نتایج بررسی شاخص های خونی

۴۶ هماتوکریت ۱-۱۱-۴
۴۷ گلبول های قرمز ۲-۱۱-۴
۴۸ گلبول های سفید ۳-۱۱-۴
۴۸ درصد لنفوسیت ها ۴-۱۱-۴
۴۹ درصد مونوسیت ها ۵-۱۱-۴
۵۰ هموگلوبین ۶-۱۱-۴
۵۰ میزان کورتیزول خون بعد از استرس حرارتی ۱۲-۴
۵۱ میزان گلوکز خون بعد از استرس حرارتی ۱۳-۴

فصل پنجم : نتیجه گیری و پیشنهادات

۵۴ بحث ۱-۵
۶۴ پیشنهادات ۲-۵
۶۵ نتیجه گیری ۳-۵
۶۷ پیوست
۷۲ منابع فارسی
۷۳ منابع انگلیسی
۸۰ چکیده انگلیسی

فهرست جداول

- (جدول ۳-۱) جیره های غذایی تیمارهای آزمایشی به تفکیک میزان ویتامین های اضافه شده..... ۲۴
- (جدول ۳-۲) ترکیب غذای مورد استفاده..... ۲۵
- (جدول ۴-۳) آنالیز شیمیایی آب استخرها و آب ورودی..... ۴۳
- (جدول ۴-۴) میزان هموگلوبین خون در ۷ تیمار آزمایشی..... ۵۰

فهرست اشکال

- ۲۳ (شکل ۱-۳) مزرعه مرزن قزل آلا واقع در مرزن آباد (مازندران)
- ۲۴ (شکل ۲-۳) نمای استخرهای تبیین شده
- ۳۰ (شکل ۳-۳) دستگاه سانتیفیوژ و سنجش درصد هماتوکریت خون

فهرست نمودارها :

۳۷ (نمودار ۴-۱) درصد افزایش وزن
۳۸ (نمودار ۴-۲) درصد ضریب رشد ویژه
۳۹ (نمودار ۴-۳) درصد ضریب
۴۰ (نمودار ۴-۴) نسبت بازده پروتئین
۴۰ (نمودار ۴-۵) ضریب تبدیل غذایی
۴۱ (نمودار ۴-۶) درصد کارایی تبدیل غذا
۴۲ (شکل ۴-۷) درصد میانگین رشد روزانه
۴۳ (نمودار ۴-۸) درصد ضریب رشد روزانه
۴۴ (نمودار ۴-۹) درصد میزان رطوبت لاشه
۴۵ (نمودار ۴-۱۰) درصد میزان پروتئین لاشه
۴۵ (نمودار ۴-۱۱) درصد میزان چربی لاشه
۴۶ (نمودار ۴-۱۲) درصد میزان خاکستر لاشه
۴۷ (نمودار ۴-۱۳) درصد میزان هماتوکریت خون
۴۷ (نمودار ۴-۱۴) تعداد گلبول های قرمز خون
۴۸ (نمودار ۴-۱۵) تعداد گلبول های سفید خون
۴۹ (نمودار ۴-۱۶) درصد لنفوسیت در گلبول های سفید خون
۴۹ (نمودار ۴-۱۷) درصد منوسیت در گلبول های سفید خون
۵۱ (نمودار ۴-۱۸) غلظت کورتیزول سرم خون
۵۲ (نمودار ۴-۱۹) غلظت گلوکز سرم خون

چکیده

تحقیق حاضر به منظور بررسی اثرات تلفیقی ویتامین E و ویتامین C بر فاکتورهای رشد و شاخص های خونی و مقاومت در برابر استرس حرارتی در قزل آلاهی رنگین کمان در مزرعه مرزن قزل واقع در شهر مرزن آباد در استان مازندران صورت پذیرفت. برای این منظور ۷ تیمار آزمایشی در سه تکرار که شامل ۷ جیره غذایی مختلف و برای ۸ هفته تبیین گردید. این بررسی از آذر ماه تا بهمن ماه سال ۱۳۹۰ به طول انجامید. تیمار های آزمایشی به ترتیب شامل: تیمار (A) شامل ۵۰ میلیگرم ویتامین C در کیلوگرم غذا، تیمار (B) ۱۰۰ میلیگرم ویتامین C در کیلوگرم غذا، تیمار (C) ۵۰ میلیگرم ویتامین E در کیلوگرم غذا، تیمار (D) ۱۰۰ میلیگرم ویتامین E در کیلوگرم غذا، تیمار (E) ۵۰ میلیگرم ویتامین C و ۵۰ میلیگرم ویتامین E در کیلوگرم غذا، تیمار (F) ۱۰۰ میلیگرم ویتامین C و ۱۰۰ میلیگرم ویتامین E در کیلوگرم غذا و تیمار شاهد (G) شامل غذای اکستروود بدون هر گونه افزودنی بودند و هر تکرار شامل ۳۰۰ عدد بچه ماهی ۱۷ گرمی بود. در پایان دوره آزمایشی زیست سنجی فاکتورهای رشد و فاکتورهای خونی تفاوت معنی داری را بین تیمارهای تلفیقی و تیمار شاهد نشان داد به این صورت که تیمار تلفیقی E با ۱۶۵,۰۴٪ دارای بالاترین درصد افزایش وزن بود که تفاوت معنی داری با تیمار شاهد نشان داد، همچنین میزان افزایش وزن روزانه، ضریب رشد ویژه و نسبت بازده پروتئین نیز در تیمار تلفیقی E بیشترین میزان بین تمام تیمارهای آزمایشی بوده که اختلاف معنی داری با تیمار شاهد داشته است ($P<0.05$)، ولی ضریب چاقی در ماهیان تیمار E با ۰,۴۹ گرم بر سانتیمتر مکعب و ضریب تبدیل غذایی با ۱,۱۷ کمترین میزان در بین تیمارهای آزمایشی بود که تفاوت معنی داری با تیمار شاهد داشت ($P<0.05$). در شمارش تعداد گلبول های سفید خون، تیمار تلفیقی E با $(69,83 \times 10^4)$ در میلیمتر مکعب و تیمار شاهد با $(28,83 \times 10^4)$ در میلیمتر مکعب تفاوت معنی داری را نشان دادند ($P<0.05$). تعداد گلبول های قرمز خون و هماتوکریت و هموگلوبین نیز به شکل معنی داری در تیمارهای تلفیقی بیشتر از تیمارهای دیگر بود. تیمار E با $1,1 \times 10^4 / \text{mm}^3$ بالاترین میزان گلبول قرمز اختلاف معنی داری با تیمار شاهد نشان داد. جهت سنجش اثر استفاده از ویتامین های E و C بر میزان مقاومت ماهیان، در انتهای بررسی ماهیان تیمارهای هفتگانه در معرض شوک حرارتی ۵ درجه سانتیگراد به مدت ۵ دقیقه قرار گرفتند. سپس با اندازه گیری میزان گلوکز و کورتیزول سرم خون، تیمارهای تلفیقی F و E با ۱۸۸,۷۴ و ۲۱۰,۸۲ نانوگرم بر میلی لیتر کمترین میزان کورتیزول و تیمار شاهد با ۲۸۵,۱۱ نانوگرم بر میلی لیتر بالاترین غلظت کورتیزول را داشتند و تفاوت معنی داری را نشان دادند ($P<0.05$). همچنین در بررسی غلظت گلوکز سرم خون ماهیان بعد از استرس حرارتی نیز تفاوت معنی داری بین تیمارهای تلفیقی F و E با به ترتیب ۷۸,۶۶ و ۸۱,۶۶ میلیگرم بر دسی لیتر و تیمار شاهد با ۱۳۶ میلیگرم بر دسی لیتر گلوکز، بدست آمد ($P<0.05$).

کلیده واژه ها: ویتامین E، ویتامین C، ضریب تبدیل غذایی، شاخص های رشد

فصل اول :

کلیات تحقیق

۱-۱- مقدمه

قزل‌آلای رنگین‌کمان با نام علمی *Oncorhynchus mykiss* (Walbaum, 1792) گونه بومی اقیانوس آرام و آمریکای شمالی است. این ماهی از خانواده آزاد ماهیان^۱ بوده و به طور معمول اندازه بدن آن متوسط تا بزرگ و پوشیده از فلس می‌باشد. از خصوصیات مهم ظاهری این گونه می‌توان به وجود باله چربی بین باله پشتی و دمی اشاره نمود که بیانگر وضعیت تغذیه‌ای و فیزیولوژیکی آن می‌باشد از آنجاییکه این ماهی یک گونه گوشتخوار می‌باشد وجود زوائد باب‌المعدی به هضم و جذب بهتر غذا به آن کمک می‌کند (بریمانی، ۱۳۵۹). بدون شک گونه قزل‌آلای رنگین‌کمان مهمترین جنس از نظر اقتصادی در خانواده آزاد ماهیان می‌باشد (Nickel et al., 1998). منشأ قزل‌آلای رنگین‌کمان از آمریکای شمالی و اقیانوس آرام بوده و در سال ۱۸۸۰ به اروپا نیز وارد گردید (Sojira et al., 2000).

این گونه در آبهای ساحلی مابین جنوب آلاسکا تا جنوب کالیفرنیا زندگی می‌کند. ساکن آب شیرین بوده ولی یک گونه مهاجر دریازی رودکوچ است. قسمت اعظم دوران زندگی این گونه در اقیانوس سپری شده و تنها برای تخم‌ریزی و گذراندن مراحل اولیه زندگی و قبل از بلوغ به رودخانه‌های آب شیرین و دریاچه‌ها برمی‌گردد به همین دلیل بیشتر گونه‌های قزل‌آلا می‌توانند به زندگی در آب دریا سازگار شوند (Sconberge et al., 1998). ماهی قزل‌آلای رنگین‌کمان گونه‌ای با ارزش تجاری بالا می‌باشد و بیماری‌های عفونی و باکتریایی در بسیاری از مزارع پرورشی یکی از دلایل عمده کاهش میزان تولید آن می‌باشد.

از اینرو برای موفقیت در تولید متراکم و انبوه استفاده از روش‌هایی به منظور تقویت سیستم ایمنی طبیعی جاندار ضروری به نظر می‌رسد (Ghosh, 2002). همچنین با توجه به اینکه سهم خوراک در رشد و بازماندگی آبزیان پرورشی و هزینه‌های تولید به ویژه در سیستم‌های متراکم بسیار قابل توجه بوده و حائز اهمیت است. بنحوی که بیش از ۵۰٪ هزینه‌های تولید را در بر می‌گیرد فرمولاسیون جیره غذایی با توجه به احتیاجات غذایی گونه ماهی، با استفاده از مواد اولیه با کیفیت مطلوب تاثیر زیادی بر بهبود روند تولید دارد (آذری تاکامی، ۸۲).

یکی از اقلام غذایی که از نظر کمی جزء ناچیز اما از نظر کیفی جزء ضروری و مهم جیره غذایی آبزیان تلقی می‌گردد ویتامین‌ها هستند که خود به دو دسته ویتامین‌های محلول در آب و ویتامین‌های محلول در

چربی تقسیم بندی می شوند (NRC,1993). با وجود اینکه ویتامین ها نقشی در تولید انرژی ندارند اما به دلیل تاثیر آنها در فرایندهای حیاتی اهمیت خاصی در جیره غذایی داشته و فقدان آنها باعث بروز اختلالات شدید در بدن خواهد شد. ویتامین ها ترکیبات آلی پیچیده ای هستند که برای رشد، سلامتی تولید مثل و نگهداری ضروری هستند اما نقش ساختمانی ندارند. تا به امروز حدود ۱۵ نوع ویتامین شناسایی شده اند که بدن ماهی قادر به تبدیل و استحصال آنها از مواد غذایی نیست و یا به میزان بسیار کمتر از حد مورد نیاز در بدن آن تولید می شوند و به همین دلیل اضافه نمودن این ویتامین ها به جیره غذایی ماهی ضروری است (Srivastava *et al.*, 2011).

در سیستم های متراکم پرورش ماهی اضافه نمودن ویتامین ها به جیره غذایی امری ضروری است. به طور کلی ویتامین ها به عنوان ترکیبات کوآنزیم باعث تسریع فعالیت های زیستی می گردند (بشارت و نظافتی، ۱۳۷۱). از آنجاییکه ویتامین های افزوده شده به غذای آماده و پلت آبزیان طی فرایند تولید و یا نگهداری در انبار از بین می روند بنابراین توصیه می شود میزان بیشتری از حد نیاز به جیره غذایی اضافه شوند و یا اینکه مدت زمان و شرایط نگهداری غذا مناسب باشد (Heen *et al.*, 1993). تعیین میزان ویتامین های مورد نیاز ماهیان امری پیچیده و بسیار وقت گیر است و ملزم به انجام آزمایشات مکرری است (Moksness *et al.*, 2004).

۱-۱-۱- ویتامین C

یکی از ویتامین های بسیار مهم محلول در آب ویتامین C ($C_6H_8O_6$) است که به نام اسید آسکوربیک نیز شناخته می شود، ویتامین C از گلوکز و سایر قندهای ساده توسط گیاهان و بسیاری از گونه های جانوری سنتز می شود. این ویتامین در طبیعت فراوان بوده و اغلب جانوران و گیاهان قادرند این ترکیب شیمیایی را از اسید گلوکورونیک بیوسنتز کنند (Keefe, 2001; Halver, 2002). ترکیبات ویتامین C بعنوان آنتی اکسیدان و کوفاکتور در واکنش حداقل ۸ آنزیم از جمله در سنتز کلاژن مورد استفاده قرار می گیرد (Mc-Dowell, 1989). علاوه بر آن ویتامین C در التیام زخم ها و جلوگیری از خونریزی مویرگی نیز مؤثر است. که این حالت در محیط پرورش آبزیان بخصوص ماهیان سردابی بوفور دیده می شود. گرچه ویتامین C در بدن بسیاری از جانداران ساخته می شود، اما پاره ای از پرندگان و ماهیها به علت نداشتن آنزیم ال گلوکولاکتون اکسیداز^۲ (Wilson, 1973) نمی توانند آن را در بدن خود سنتز نمایند یا اینکه میزان تولید آن در بدن نیازهای ضروری متابولیک را تامین نمی کند. افزودن ویتامین C به خوراک روزانه ماهیان استخوانی آب شیرین بسیار ضروری است، در غیر اینصورت با کمبود این ویتامین مواجه می شوند که به سندروم کمبود ویتامین C

^۲ L-gulocolactone

مشهور است و باعث ناهنجاری ستون فقرات و انحنای ساقه دمی^۳ و تیرگی پوست میگردد. البته در محیط‌های دریایی بدلیل وجود جلبک‌ها و ترکیبات یددار این حالت کمتر برای ماهیان دریایی روی می‌دهد. براین اساس آزاد ماهیان نیز در محیط‌های آب شور کمتر دچار این عوارض شده اما در محیط آب شیرین در صورت کمبود ویتامین C در جیره غذایی با این مشکلات روبه‌رو خواهند شد.

اسید آسکوربیک به عنوان یک آنتی اکسیدان قوی زیستی در واکنش های هیدروکسیلاز در سلول و بافت عمل می کند (Gabaudan and verlhac, 1994). گلبول های سفید نیز قادرند مقدار زیادی اسید آسکوربیک در خود ذخیره کنند این ویتامین یک آنتی اکسیدان قوی است و می تواند مقاومت سلول را در برابر عوامل اکسید کننده ارتقاء داده و از سلول محافظت کند (Verlhac et al., 1995).

به طور کلی، از جمله اثرات اسید آسکوربیک می‌توان به تاثیر آن در بهبود و ارتقاء عملکرد دستگاه ایمنی (Hardie et al., 1991)، مقاومت در برابر استرس (Henrigue et al., 1998)، حرکت گله‌ای ماهیان^۴ (Koshio et al., 1997) و اکسیداسیون (Shiau and Hsu, 2002) اشاره نمود. همچنین ویتامین C، در فعالیت ویتامین D و سوخت و ساز آهن مؤثر بوده و همراه با ترشحات بافت آدرنال باعث کاهش اثر استرس‌های محیطی می‌گردد (Lovell, 1989).

از دیگر عملکردهای این ویتامین می‌توان به نقش آن در فرایندهای بیوشیمیایی ساخت کلاژن (یکی از اجزای اصلی غشاء بافت پیوندی) اشاره نمود (Oikawa et al., 2008). از جمله عوارض کمبود ویتامین C نیز می‌توان به کاهش رشد، کاهش پاسخ های ایمنی، تغییر شکل ستون مهره، تاخیر در بهبود زخم، تضعیف عملکرد دستگاه تولیدمثل، حرکات غیر طبیعی باله، آبشش و چشم ها و افزایش پارگی مویرگی (پتشی) اشاره نمود (Xie and Niu, 2006).

میزان مناسب اسید آسکوربیک در جیره غذایی ماهیان به خصوص در مراحل ابتدایی زندگی نقش بسزایی بر مقاومت، بقاء و سلامتی ماهیان دارد. عملکرد مثبت این ویتامین محلول در آب مثل، شکل‌دهی به مواد درون سلولی در بافت، شکل‌دهی استخوان، رسیدگی اریتروسیت‌ها، مصرف آهن، حفظ میزان هموگلوبین و بسیاری از موارد دیگر نشان دهنده این است که اسید آسکوربیک تاثیر مستقیمی بر سلامت ماهی و بهبود مقاومت آن در برابر عوامل بیماری‌زا دارد (Navarre, 1989). میزان نیاز و تاثیرات این ویتامین بر سلامتی در گونه های مختلف آبزیان متفاوت بوده و در تحقیقات مختلف محققین مقادیر متفاوتی برای آن پیشنهاد شده است (Azad et al., 2007; Lim et al., 2002; Garcia et al., 2007) همچنین این میزان تحت تاثیر گونه ماهی، سایز و فرمولاسیون جیره غذایی و نوع سیستم پرورش قرار می گیرد (Ai et al., 2004).

^۳ Lordosis, Sclorosis
^۴ schooling

عواملی همچون نور، هوا، حرارت، مس و آهن باعث اکسیداسیون اسیدآسکوربیک می شوند در ضمن ناپایداری بالای این ویتامین باعث گردیده که همواره میزان واقعی آن در جیره غذایی کمتر از میزان مورد انتظار باشد (Webster, 2002). در مورد میزان نیاز آزاد ماهیان به ویتامین C مطالعات زیادی انجام شده است و این میزان برای برخی گونه‌های آزاد ماهیان مشخص شده است (Halver et al, 1969).

میزان نیاز ماهیان به ویتامین C نسبت به مراحل رشد آنها متفاوت می‌باشد (مثلاً در زمان رشد گنادها یا در مرحله رشد لاروی) (Dabrowski & Ciereszko, 2001). به مانند دیگر مهره‌داران اسید آسکوربیک نقش حیاتی در کیفیت گامت‌های ماهیان دارد (Dabrowski & Ciereszko, 2000). اگر برای مدت طولانی اسید آسکوربیک از جیره غذایی ماهی حذف شود، باعث کاهش تراکم اسپرم و میزان تحرک و قابلیت باروری می‌شود و ضریب پراکسید شدن چربی در اسپرم را افزایش می‌دهد (Ciereszko & Dabrowski, 1995). ماهیان استخوانی به علت کمبود گلوکولاکتون اکسیداز که به عنوان آنزیم پایانی در سنتز اسید آسکوربیک نقش دارد، قادر به سنتز اسید آسکوربیک همچون دیگر مهره‌داران نمی‌باشند و باید این ماده به غذای آنها اضافه شود. از طرف دیگر این ویتامین بسیار ناپایدار بوده و در فرایند های حرارتی تولید مخصوصاً در غذای اکستروود از بین می‌رود. به همین دلیل به طور معمول به مخلوط مولتی ویتامین ها اضافه نمی‌شود. شکل های متفاوتی از پوشش برای ارتقا پایداری این ویتامین در غذای ماهی استفاده می‌شود که از آن جمله می‌توان به اتیل سلولز یا پوشش های چربی اشاره نمود. با این وجود، حدود ۵۰ درصد از ویتامین C در طی فرایند تولید غذای ماهی از بین می‌رود، به همین علت برای اطمینان از کافی بودن میزان ویتامین C باید مقدار تکمیلی (برای جبران میزان تحلیل رفته طی تولید) به غذاهای تجاری اضافه نمود (lovell & lim, 1987).

از جمله آمینواسیدهایی که نقش کلیدی در پایداری و ثبات کلاژن ایفا می‌کنند می‌توان به پرولین و هیدروکسی پرولین اشاره نمود. ویتامین C یک عامل مؤثر برای تشکیل پرولین هیدروکسی لاز می‌باشد که این آنزیم باعث هیدروکسیلاسیون پرولین و تشکیل پرولین هیدروکسیلاز می‌شود (Nelson & Cox, 2005). افزودن اسید آسکوربیک به غذای ماهیان موجب افزایش تولید آنتی بادی های ضد باکتری، فعالیت های فاگوسیتوزی و لیزوزیمی گردیده و نقش مهمی در کاهش استرس و افزایش مقاومت در برابر عوامل استرس زا دارد (Hardie et al., 1999; Henrique et al., 1998; Shiao & Hsu, 2002).

استفاده از اسیدآسکوربیک در جیره غذایی با تقویت تعداد لنفوسیت ها می تواند به افزایش قدرت دفاعی ماهی به ویژه در دوره های طولانی مصرف منجر گردد. بروز روند افزایشی در لنفوسیت ها طی شاخص های زمانی نشان دهنده اثرات مثبت اسید آسکوربیک بر بهبود وضعیت ایمنی و کاهش استرس های مزمن می باشد و این امر منجر به ارتقاء مقاومت بدنی و افزایش سازگاری با محیط پرورشی در ماهیان می گردد (Innocent et al., 2011; Garcia et al., 2007).

۱-۲-۱- ویتامین E

ویتامین E از ترکیباتی تحت عنوان آلفاتوکوفرولها می باشد که آلفاتوکوفرول مهمترین آنهاست. ویتامین E با فرمول ($C_{22}H_{50}O_2$) یک ترکیب آلی هتروسیکلیک^۵ مشتق از هسته کرومان^۶ می باشد. به طور کلی ویتامین E به گروهی از ترکیبات فعال که به یکدیگر شباهت زیادی دارند، اطلاق می شود (Nakagawa *et al.*, 2007). ویتامین E یک آنتی اکسیدان قوی است که موجب افزایش حیات و دوام اریتروسیت ها می شود و نقش اساسی را در تنفس سلولی بازی می کند (Hung *et al.*, 1987). از معمول ترین نشانه های کمبود ویتامین E می توان به دیستروفی ماهیچه ای^۷ شامل نکروز عضلات سفید، آب آوردگی قلب، عضله و بافتها و آنمی اشاره نمود (Gabaudan & Hardy, 2000). آلفاتوکوفرول استات^۸ شکلی از ویتامین E است که در جیره غذایی آبزیان استفاده می شود. این ماده بعد از هیدرولیز استات در بدن ماهی به شکل فعال به عنوان آنتی اکسیدان تبدیل می شود (Anderson & Sunderland, 2002). برخی محققان معتقدند ویتامین E نقش مهمی در تغییر میزان کورتیزول پلازما در شرایط ایجاد استرس را دارد (Montero *et al.*, 1998. Belo *et al.*, 2005).

۱-۳-۱- شاخص های خونی

از آنجاییکه مطالعات خون شناسی ابزار ارزشمندی در تعیین شرایط فیزیولوژیکی در ماهیان محسوب می شوند، بنابراین می توان از پارامترهای خونی به عنوان شاخص های شرایط فیزیولوژیکی و پاسخ در برابر استرس و عوامل استرس زا در ماهی، نسبت به تغییراتی با منشاء داخلی یا خارجی استفاده نمود (Cataldi *et al.*, 1998; Belanger *et al.*, 2001). عناصر سلولی خون شامل اریتروسیت ها، لوکوسیت ها و ترومبوسیت ها هستند. گلبول های قرمز یا اریتروسیت ها با استفاده از هموگلوبین در انتقال اکسیژن و گاز کربنیک نقش دارند (Bok *et al.*, 1996). گلبول های سفید یا لوکوسیت ها کار دفاع از بدن را انجام می دهند در حالیکه ترومبوسیت ها یا پلاکت ها در انعقاد خون نقش دارند (Siakper *et al.*, 2008). تعیین فاکتورهای خونی و بررسی وضعیت تغییرات گلبول های قرمز و سفید همواره در تشخیص بیماری موجودات زنده مطرح بوده است (شاهسونی و همکاران، ۱۳۸۰).

Heterocyclic^۵
chromano^۶
Muscular dystrophy^۷
 α -tocopheryl acetate^۸

۱-۳-۱-۱- گلبول های قرمز یا Erythrocytes

گلبول های قرمز یا اریتروسیت ها^۹ بیشترین سلول های خونی هستند. تولید سلول های خونی در ماهیان در مناطق مختلفی انجام می پذیرد. گلبول های قرمز در ماهیان عمدتاً در کلیه و طحال ساخته می شوند. معمولاً بخش قدامی کلیه مهم ترین محل خون سازی است (ستاری، ۱۳۸۱). بسیاری از دانشمندان بیان می کنند که شاخص تعداد گلبول های قرمز می تواند تحت تأثیر نحوه تغذیه و نوع ترکیبات جیره غذایی از جمله ویتامین های E و C قرار گیرند بطوریکه در برخی دارای اثر مثبت و در برخی کم اثر یا بی اثر بوده است. ویتامین C باعث افزایش گلبول های قرمز خون می شود. افزایش تعداد گلبول های قرمز با اضافه شدن مقادیر ویتامین C می تواند به علت اثر مستقیم ویتامین C بر روی اریتروپوئیزیس^{۱۰} باشد (Dinning, 1962; Cox, 1978). تأثیر ویتامین C در افزایش گلبول قرمز خون می تواند موجب انتقال و عرضه بیشتر اکسیژن در خون ماهی و در نهایت در بافتها شده و موجب ارائه پاسخ فیزیولوژیکی بهتر در ماهی شود (Affonso *et al.*, 2007). تأثیر ویتامین C در افزایش گلبول قرمز خون می تواند موجب انتقال و عرضه بیشتر اکسیژن در خون ماهی و در نهایت در بافتها شده و موجب ارائه پاسخ فیزیولوژیکی بهتر در ماهی شود (Affonso *et al.*, 2007). ویتامین های E و C می توانند از غیرفعال شدن سیستم ایمنی پیشگیری کرده و مقاومت غشاهای گلبول های قرمز را افزایش دهند (Beno *et al.*, 2005).

۱-۳-۲-۱- گلبول سفید یا Leucocytes

گلبول های سفید از متنوع ترین سلول های خونی هستند که به دو گروه تک هسته ای (لنفوسیت و منوسیت) و چند هسته ای (بازوفیل، نوتروفیل و ائوزینوفیل) تقسیم می شوند (شاهسونی و همکاران، ۱۳۸۷). قسمت اعظم گلبول های سفید در ماهیان را لنفوسیت ها تشکیل می دهند که برای مقابله با بیماری های ویروسی کاربرد دارند (Groff & Zinkl, 1999; Ellis, 1989). لنفوسیت ها به نوبه خود به دو گروه B cells و T cells تقسیم می شوند که لنفوسیت های B قابلیت تولید آنتی بادی داشته و به پلاسماسل تبدیل می شوند در حالیکه لنفوسیت های T در کنترل پاسخ های ایمنی دخیل هستند (Takashima, 1997). لنفوسیت ها در خون ماهیان از نوع فعال می باشد یعنی شکل کلی آن مدور و مجهز به پاهای کاذب ریز در دید میکروسکوپ الکترونی می باشد (Siakper, 2008). لنفوسیت ها از نظر تعداد بعد از گلبول قرمز رتبه دوم را در خون ماهیان دارند که در مواجهه با استرس این تعداد کاهش می یابد (Takashima, 1999).

^۹ Erythrocytes
^{۱۰} Erythropoiesis

منوسیت ها از دیگر سلول های خونی در ماهیان می باشند که عمل ماکروفاژ را انجام می دهند (Siakper, 2008). منوسیت ها از نظر ظاهری تقریباً کروی بوده و دارای یک هسته بزرگ می باشند (Siakper, 2008). اما بازوفیل ها با داشتن دانه های بزرگ و قابلیت رنگ پذیری بالا قابل تمایز ترین سلول های گلبول های سفید هستند، بازوفیل ها قدرت بیگانه خواری کمی دارند (شاهسونی و همکاران، ۱۳۸۷). اما بیشترین گلبول های سفید چند هسته ای نوتروفیل ها هستند که عملکرد اصلی آنها دفاع از بدن در برابر عفونت های باکتریایی می باشد. نوتروفیل ها با قدرت تحرک بالا سریعاً در منطقه آسیب دیده و عفونی نفوذ نموده و و همین امر باعث می شود که در منطقه عفونت دیده شود (Siakper, 2008). تعداد گلبول های سفید همراه با نسبت انواع آنها از شاخص های مهم سلامت و وضعیت سیستم ایمنی در جانوران به شمار می رود این سلول ها قابلیت بالایی در انباشت ویتامین C نیز دارند (Shalaby *et al.*, 2006). سطوح لنفوسیتی در آبزیان همانند پستانداران می تواند متأثر از میزان استرس و هورمون ها باشد (Ellis, 1989).

۱-۴-۱-۱- استرس

استرس یک امر اجتناب ناپذیر در سیستم های متراکم پرورش ماهی است که طی جابه جایی، صید، رقم بندی، دستکاری غیره ایجاد می شود. استرس در ماهیان باعث کاهش ایمنی و افزایش احتمال بیماری می گردد بنابراین شناخت دقیق رفتارهای فیزیولوژیکی ماهی و مدیریت دقیق محیط در جهت کاهش عوامل استرس زا در سیستم های پرورش امری بسیار حیاتی است (Kubulay *et al.*, 2002). عوامل استرس زا مجموعه عکس العمل های فیزیولوژیکی را در ماهی ایجاد می کنند از اینرو این تغییرات فیزیولوژیکی به عنوان نشانگر استرس استفاده می شود. در اکثر مطالعاتی که در زمینه استرس انجام شده است سطح هورمون کورتیزول در سرم خون به عنوان مهمترین پارامتر فیزیولوژیکی در تشخیص استرس مورد استفاده قرار می گیرد (Wendelaar, 1997).

پاسخ ماهی به استرس به سه مرحله تقسیم می شود؛ مرحله ابتدایی، ثانویه و مرحله سوم (Barton, 2002). فاز ابتدایی شامل ترشحات عصبی است که در آن کتکول آمین ها (اپی نفرین و نوراپی نفرین) و کورتیزول به ترتیب از کرومافین و سلول های داخلی ترشح می شوند. چرخش بیشتر این هورمون ها در خون مرحله دوم را به راه می اندازد که شامل عکس العمل های فیزیولوژیکی و متابولیکی می شود به عنوان مثال در این مرحله در نتیجه افزایش گلیکوژنس و گلیکونئوژنس، میزان قند خون افزایش یافته، گشاد شدن سرخرگ ها در فیلامنت های آبششی و افزایش حجم پمپاژ خون توسط قلب در نتیجه باعث کاهش سطح ایمنی بدن می شود (Gratzek, 1984).

در مراحل اولیه و ثانویه استرس ماهی می‌تواند خود را با شرایط منطبق ساخته و تعادل حیاتی خود را حفظ کند اما در صورت ادامه شرایط ماهی وارد فاز سوم استرس می‌شود که در این مرحله ماهی دیگر قادر نخواهد بود با شرایط وفق یافته و در نتیجه سلامت عمومی خود را از دست خواهد داد در این حالت مقاومت در برابر بیماری، کاهش نرخ رشد و تولیدمثل کاهش چشمگیری می‌یابد (Barton, 2002). در زمان مواجهه با عوامل استرس‌زا میزان کورتیزول به سرعت افزایش یافته و این افزایش در میزان کورتیزول حساسیت ماهی را در برابر آلودگی‌های قارچی، باکتریایی و انگلی افزایش می‌دهد (Kubulay, 2002). میزان کورتیزول در سرم خون ماهی در حالت معمولی کم و در حدود ۱,۴۷ میکروگرم بر دسی‌لیتر^{۱۱} اما در ماهیانی که تحت استرس قرار گرفته‌اند این میزان افزایش یافته و به حدود ۵,۵۰ میکروگرم بر دسی‌لیتر می‌رسد (Kubulay et al., 2002).

۱-۲- بیان مسئله تحقیق

پرورش ماهی قزل آلا در کشور ما سابقه ای حدود نیم قرن دارد و میزان تولید آن از حدود ۸۰۰ تن در سالهای اولیه انقلاب به حدود ۱۰۶۰۰۰ تن در سال ۱۳۹۰ رسیده است (سالنامه آماری شیلات ایران). از آنجاییکه که صنعت آبزی پروری با مشکلات متعددی از جمله مشکل تامین غذای مناسب و تلفات بالا مخصوصاً در مرحله بچه ماهی مواجه می‌باشد، به همین دلیل یکی از کلیدهای مهم در پرورش موفقیت آمیز ماهی قابلیت دسترسی به غذای مناسب می‌باشد تا بتواند سلامتی و رشد را در همه مراحل تضمین نماید (Girri et al., 2002). طی سالهای اخیر پیشرفت‌های زیادی در زمینه تغذیه و جیره نویسی آبزیان در پرورش بدست آمده است که در نتیجه راندمان تولید و بازده اقتصادی مزارع پرورشی بهبود یافته است. در تمامی سیستم‌های پرورشی ماهی تغذیه مناسب مهمترین عامل در حفظ سلامت و افزایش مقاومت در برابر بیماری و شرایط نامناسب محیطی می‌باشد (Emer et al., 2004). مدیریت نامناسب در تغذیه و کمبود ویتامین‌ها و دیگر مواد معدنی در جیره غذایی باعث بروز بیماری‌های تغذیه‌ای و در نتیجه کاهش راندمان تولید می‌شود (احتشامی، ۱۳۸۶).

ارتقاء عملکرد دفاعی ماهی در برابر عوامل بیماری‌زا، بهترین نحوه پرورش ماهی سالم است. گلبول سفید به عنوان یکی از عوامل اصلی دفاع در برابر عوامل ناخواسته در بدن محسوب می‌شود. نوسان تعداد هر کدام از فاکتورهای خونی با توجه به وضعیت فیزیولوژیکی بدن می‌تواند شاخص مناسبی برای ارزیابی وضعیت ایمنی ماهیان محسوب شود (Hrubec et al., 2001).

^{۱۱} µg/dl

۱-۳- اهمیت و ضرورت انجام تحقیق

کیفیت آب پرورش ماهیان سردابی به وسیله درجه حرارت و همچنین تراکم ذخیره‌سازی از عوامل مهم در ایجاد استرس و بروز پدیده‌های مضر مرفولوژیک و متابولیک است که فقر ویتامین‌های C و E میتواند بر حدت این مساله بیافزاید. مقدار مناسب ویتامین‌ها در جیره غذایی برای جلوگیری از این مشکلات تابعی از شرایط محیطی و نوع مدیریت پرورش در مزرعه است. بنابراین محققین مقادیر متفاوتی را برای گونه قزل‌آلا بررسی و پیشنهاد نموده‌اند. قبلاً میزان مناسب ویتامین E مورد نیاز برای قزل‌آلای رنگین‌کمان ۳۰-۱۰۰ میلی‌گرم در کیلوگرم غذا تخمین زده شده بود (NRC, 1993). ولی Yildiz در سال ۲۰۰۴ در بررسی خود به این نتیجه رسید که افزایش ویتامین E در جیره غذایی اثر مطلوبی در بهبود FCR در ماهی قزل‌آلا دارد و در این بررسی میزان ویتامین E مورد نیاز را تا ۵۰۰ میلی‌گرم در کیلوگرم غذا عنوان نمود.

در کشور ما ویتامین‌ها در اشکال و ترکیبات متفاوت و با درجه خلوص متفاوت مورد استفاده قرار می‌گیرند و عملاً مقدار مؤثر و مطلوب نامشخص می‌باشد. یکی از عوامل بسیار مهم در تقویت و یا تضعیف سیستم دفاعی ماهیان شرایط تغذیه ای می باشد (Kori-Siakpere et al., 2005).

حدود ۱۰۶۰۰۰ تن ماهی قزل‌آلا در سیستم آبی‌پروری کشور تولید می‌شود. بدلیل وجود اقلیم‌های متفاوت در کشور شرایط پرورش و تولید در مناطق مختلف با یکدیگر تفاوت داشته که به مدیریت پرورش و نیازهای تغذیه‌ای ماهی بستگی دارد. سالانه مقدار قابل توجهی از این محصول بدلیل مسایل ناشی از سوء تغذیه در مراحل اولیه رشد و بچه ماهی تلف می‌شوند، که اگر بتوان حجم این تلفات را با بهبود جیره غذایی کاهش داد یکی از مؤلفه‌های بسیار مؤثر در افزایش ظرفیت موجود در تولید خواهد بود.

بررسی‌های متفاوتی در زمینه نقش ویتامین C در جیره غذایی آبزیان انجام شده است اما همانطور که گفته شد میزان مؤثر ویتامین تابع سن ماهی و شرایط پرورش و پارامترهای دیگر می باشد. از سوی دیگر با توجه به اینکه ویتامین‌های E و C بعنوان تقویت کننده سیستم ایمنی هر یک به تفکیک مورد توجه بوده‌اند و تاکنون اثرات تلفیقی آنها مورد بررسی قرار نگرفته است، بنابراین نکته مهم در این تحقیق بدست آوردن اثرات تلفیقی این ویتامین‌ها بر رشد و بهبود راندمان تولید و شاخص‌های خونی و نیز مقاومت در برابر استرس درجه حرارت در ماهی قزل‌آلا می باشد.

۱-۴- اهداف تحقیق

- ❖ بهبود مدیریت تولید قزل‌آلا در سیستم بازپرورش آب
- ❖ دستیابی به دوز مناسب ویتامین‌های E و C در جیره غذایی ماهی قزل‌آلای رنگین‌کمان
- ❖ بهبود شاخص‌های رشد و بقا در ماهی قزل‌آلای رنگین‌کمان و کاهش FCR

۱-۵-فرضیه‌های تحقیق

- ❖ فرضیه H_0 : کاربرد توام ویتامین‌های C و E میتواند شاخص‌های رشد و بقاء را افزایش داده و سیستم ایمنی را تقویت نماید.
- ❖ فرضیه H_1 : کاربرد توام ویتامین‌های C و E نمیتواند شاخص‌های رشد و بقاء را افزایش داده و سیستم ایمنی را تقویت نماید.

فصل دوم:

ادبیات و مستندات و پیشینه تحقیق

پیشینه تحقیق:

در سال ۱۹۸۵، Bell و همکارانش برخی از اثرات ویتامین E و فقدان سلنیوم را در میزان آنزیم‌های بافتی و شاخص‌های پراکسیدهای بافتی در ماهی قزل‌آلای رنگین کمان را بررسی نمودند. در نتیجه در تیماری که میزان ویتامین E و سلنیوم کمتر بود وزن نهایی ماهیان از دیگر تیمارها، کمتر بود. میزان فعالیت آنزیم GSH در کبد و پلاسما در ماهیانی که از غذای حاوی سلنیوم (کمتر از حد مورد نیاز) استفاده می‌کردند کاهش داشت اما متأثر از میزان ویتامین E بود اما کاهش سلنیوم در فعالیت GSH تأثیر چندانی نداشت. فعالیت پلاسمایی پیرووات کیناز در جیره‌های غذایی که از نظر هر دو عنصر کمبود داشت افزایش قابل توجهی نشان می‌داد.

در سال ۱۹۸۹، Navarre و همکارانش اثر استفاده از جیره‌های غذایی حاوی ویتامین C را در مقاومت در برابر بیماری و تولید آنتی بادی در ماهی قزل‌آلای رنگین کمان بررسی نمودند. در این بررسی از جیره‌های غذایی شامل ۱،۵،۱۰ و ۲۰ برابر ماکسیمم نیاز ماهی به ویتامین C استفاده شد. این بررسی نشان داد میزان مقاومت ماهی قزل‌آلا در برابر بیماری‌های باکتریایی و تولید آنتی بادی‌های مخاطی در ماهیانی که توسط جیره‌های غذایی حاوی ۵ و ۱۰٪ بیشتر از ماکزیمم مورد نیاز ویتامین C بودند به حد قابل توجهی بهبود می‌یابد.

در سال ۱۹۹۲، Ishibashi و همکارانش اثر ویتامین C را در طوطی ماهی در شرایط استرس بررسی نمودند. بررسی آنها نشان داد ماهیان که با جیره غذایی حاوی اسیدآسکوربیک تغذیه شده بودند نسبت به استرس کمبود اکسیژن قوی‌تر هستند. آنها به این نتیجه رسیدند که اسیدآسکوربیک در شرایط کمبود اکسیژن از اثرات تناوبی استرس جلوگیری نموده و شرایط هایپراکسی باعث افزایش نیاز اسیدآسکوربیک می‌شود.

در سال ۱۹۹۸، Meseguer و همکارانش اثر استفاده از ویتامین E و C را در سیستم ایمنی غیر اختصاصی در ماهی سیم دریایی gilthead (*Sparus aurata L.*) بررسی نمودند. آنها در یک دوره ۴۵ روزه از چهار تیمار (شاهد، VC ۳ گرم بر کیلوگرم، VE ۱،۲ گرم بر کیلوگرم، و تیمار تلفیقی) استفاده نمودند. نتیجه

بررسی آنها نشان داد فعالیت فاگوسیتیک در ماهیانی که تنها از ویتامین E در جیره غذایی تغذیه کرده بودند نسبت به تیمار ویتامین C بالاتر بوده و در مقابل ماهیان تیمار ویتامین C دارای بالاترین میزان فعالیت انفجار تنفسی در گلبول های سفید خون بودند. اما بررسی آنها نشان داد استفاده تلفیقی از این دو ویتامین دارای اثر مکملی بوده است به این صورت که ماهیانی که از جیره تلفیقی تغذیه کرده بودند دارای بالاترین میزان در انفجار تنفسی در فاگوسیت ها بودند. لازم به ذکر است این تحقیق تفاوت معنی داری را در میزان رشد تیمارهای حاوی ویتامین نشان نداد.

در سال ۲۰۰۰، Troutaud و همکارانش تاثیر ویتامین E را روی عملکرد فاگوسیتوز در لوکوسیت های روده و بخش قدامی کلیه در ماهی قزل آلائی رنگین کمان بررسی نمودند. در دو تیمار متفاوت شامل ۰,۲۸ و ۲۹۵ mg/kg ویتامین E ماهی ها به مدت ۸۰ روز مورد بررسی قرار گرفتند. نتایج بدست آمده نشان داد افزودن ویتامین E باعث بالا رفتن توانایی فاگوسیتوز در لوکوسیت های روده می شود در نتیجه مقدار ویتامین E در ایمنی غیراختصاصی نسبت به ایمنی اختصاصی (قدامی کلیه) تاثیر بیشتری دارد. همچنین این بررسی نشان داد که فاگوسیت های روده نقش تعیین کننده ای در ایمنی موکوسی غیر لنفاوی در ماهی ها دارند.

در سال ۲۰۰۱، Clerton و همکارانش تاثیر تغذیه با ویتامین E را روی عملکرد فاگوسیت و تاثیر روی لکوسیت های روده و کلیه در ماهی قزل آلائی رنگین کمان را بررسی نمودند. این بررسی برخی عملکردهای ارتقاء یافته فاگوسیت در ماهیانی که توسط ویتامین E تغذیه شده بودند را نشان داده است اما این تاثیر فقط در لکوسیت های روده قابل ملاحظه بود. در نتیجه این بررسی آنها اثبات نمودند که لکوسیت های روده در دفاع غیراختصاصی (موکوس ماهی) نقش اساسی بر عهده دارند.

در سال ۲۰۰۲، Geatlin و Sealey با بررسی تاثیر واکنش بین ویتامین های C و E جیره غذایی بر رشد ماهیان جوان باس راه راه با وزن اولیه ۱۲ گرم و بعد از ۱۰ هفته پرورش یافتند که کارایی غذا بطور معنی داری تحت تاثیر ویتامین جیره بوده است. اختلاف معنی داری بین سطوح ویتامین C و E نیز مشاهده شد. سطوح مورد استفاده از ویتامین C کارایی تغذیه را افزایش داده بود.

در سال ۲۰۰۲، Kubulay و همکارانش اثر فاز حاد استرس را در ماهی قزل آلائی رنگین کمان بررسی نمودند در این بررسی آنها میزان کورتیزول، گلوکز و لیزوزوم را در سرم خون ماهیانی که ۱۰ دقیقه در استرس قرار گرفته بودند تعیین نمودند. نتایج بررسی آنها نشان داد میزان کورتیزول خون در ماهیان تخت

استرس تا ۵ برابر حالت نرمال افزایش یافته و در نتیجه افزایش میزان گلیکوژنوسیس میزان گلوکز خون نیز افزایش یافته که می‌توان افزایش میزان گلوکز را به عنوان نشانگر ثانویه استرس اشاره نمود.

در سال ۲۰۰۳، Batzios و همکارانش بازده تولید مثلی قزل‌آلای رنگین‌کمان را با استفاده از جیره‌های غذایی غنی شده با ویتامین C بررسی نمودند. آنها از ۴ تیمار شامل (۲۴۰۰، ۱۲۰۰، ۸۰۰، ۶۰۰ و ۰) میلی‌گرم بر کیلوگرم غذا ویتامین C، به مدت ۱۴۴ روز استفاده کردند. در نتیجه این بررسی آنها متوجه شدند که بالا بردن میزان ویتامین C نقش تاثیرگذاری در میزان باروری و قطر تخم ندارد اما به طور قابل توجهی در قابلیت تخمه‌گشایی، درصد تولید لارو و نیز رشد و بقای لارو با کیسه زرده داراست. بهترین میزان استفاده از ویتامین C در این بررسی ۱۲۰۰ میلی‌گرم بر کیلوگرم غذا در قزل‌آلای رنگین‌کمان توصیه شده است که نه تنها تخمه‌گشایی^{۱۲} را تسریع می‌بخشد بلکه درصد بقا و درصد تولید لارو را ارتقا می‌دهد.

در سال ۲۰۰۳، Dong و همکارانش تاثیر استفاده از میزان مطلوب و میزان بیش از حد نیاز ویتامین E و چربی را در عملکرد ماهی، خصوصیات فیله و شاخص‌های سلامت در ماهی قزل‌آلای رنگین‌کمان بررسی نمودند. آنها در بررسی خود از جیره‌های غذایی حاوی ۱۵ و ۳۰ درصد چربی به علاوه ۱۵۰۰ و ۳۰۰ میلی‌گرم بر کیلوگرم غذا ویتامین E استفاده نمودند. در نتیجه نرخ رشد ویژه و درصد کارایی پروتئین^{۱۳} و وزن نهایی در تیماری که چربی بالاتری داشت به میزان قابل ملاحظه‌ای بالاتر بود. همه پارامترهای مربوط به سلامت در این بررسی در همه تیمارها نرمال بودند اما بیشتر آنها تحت تاثیر میزان چربی جیره غذایی قرار گرفتند. در تیمارهایی که میزان ویتامین E در آنها بیشتر بود ضریب تبدیل غذایی افزایش داشت اما افزایش میزان ویتامین E در این بررسی تاثیری روی فاکتورهای سلامت ماهی نشان نداد. از آنجاییکه بالا بردن چربی غذا باعث افزایش وزن ماهی می‌شود اما همیشه مضرات چربی از جمله اکسید شدن آن در فیله ماهی وجود دارد که در نتیجه این بررسی بالا بردن میزان ویتامین E این نقیصه را بر طرف می‌کند زیرا در نتیجه این بررسی میزان ویتامین E در عضلات ماهی افزایش چشمگیری نشان داد.

در سال ۲۰۰۳، Kamireddy و همکارانش اثر اضافه نمودن ویتامین E را به جیره غذایی در کیفیت و مدت نگهداری فیله ماهی قزل‌آلای رنگین‌کمان بررسی نمودند. در این بررسی میزان ۵۰۰۰ میلی‌گرم بر کیلوگرم غذا آلفاتوکوفرول به ازای هر کیلوگرم به غذای ماهی در مدت زمان ۹، ۷، ۵، ۴، ۳ و ۲ هفته اضافه شد. در نتیجه

^{۱۲} hatching
^{۱۳} PER

این بررسی ماهی‌هایی که مدت طولانی‌تری از ویتامین E تغذیه شده بودند کیفیت فیله بهتری داشته و میزان ویتامین E در بافت آنها بالاتر بود. مدت زمان ماندگاری گوشت در سردخانه بالاتر بوده و اسیدهای چرب در مدت زمان نگهداری ثبات بیشتری داشتند.

در سال ۲۰۰۳، Kiron و همکارانش تاثیر استفاده از دو سطح متفاوت از ویتامین E همراه با چربی را در خاصیت آنتی‌اکسیدانی و عکس‌العمل‌های غیر اختصاصی ایمنی در ماهی قزل‌آلای رنگین‌کمان مورد بررسی قرار دادند. در این بررسی از ۳ نوع چربی روغن کبد ماهی پولاک (PO)، روغن تخم کتان (LO) و روغن آفتابگردان (SO) که هر کدام با دو میزان متفاوت (۱۰۰، ۱۰۰۰) میلی‌گرم در کیلوگرم ویتامین E ترکیب شده بود برای مدت ۹ هفته استفاده شد. در نتیجه میزان رشد به صورت چشمگیری در تیمارهای PO و LO با میزان ویتامین E بیشتر، افزایش یافت. اندازه هماتوکریت نیز در این تیمارها بالاتر بود. میزان هیدروپراکسید در گلبول‌های قرمز خون و سوپرپراکسید دیسموتاز SOD در پلاسمای خون در تیمارهای شامل ۱۰۰۰ میلی‌گرم بر کیلوگرم غذا ویتامین E در سطح بالاتری قرار داشت که این امر مبین این نکته است که خاصیت آنتی‌اکسیدانی ویتامین E در سطوح بالا نسبت به مقادیر پایین‌تر ویتامین تفاوت چندانی ندارد.

در سال ۲۰۰۳، Wahli و همکارانش اثر استفاده از ویتامین C در جیره غذایی در بهبود زخم در ماهی قزل‌آلای رنگین‌کمان را بررسی کردند. در این بررسی آنها از سه جیره غذایی شامل ۲۰، ۱۵۰، ۱۰۰۰ میلی‌گرم به ازای هر کیلوگرم غذا را به مدت ۴ هفته برای ماهیان در نظر گرفتند سپس ماهیان را در معرض ویروس قرار داده و روند بهبود را در آنها مورد بررسی قرار دادند. بررسی آنها نشان داد میزان انباشت ویتامین C در بافت ماهیانی که از ویتامین C بیشتری تغذیه کرده بیشتر بوده و روند بهبود زخم در آنها سریعتر از ماهیان تیمارهای دیگر بود.

در سال ۲۰۰۴، تاکامی و همکارانش اثرات تغذیه‌ای ناپلیوس آرتیمیا غنی شده با ویتامین C را روی رشد، درصد بقا و مقاومت استرس‌های محیطی در لاروهای قزل‌آلای رنگین‌کمان را بررسی نمودند. بررسی آنها نشان داد تیماری که توسط غذای کنسانتره به علاوه آرتیمای غنی شده با ویتامین C تغذیه شده بود نسبت به تیمارهایی که فاقد ویتامین C در جیره غذایی‌شان بودند رشد بیشتری داشته و همچنین مقاومت در برابر استرس و درصد بقا نیز در این تیمار بیشتر از بقیه تیمارها بوده است.

در سال ۲۰۰۴، Dabrowski و همکارانش تاثیر اسید آسکوربیک را در استرس اکسایشی (هیپوکسی^{۱۴} یا هایپرکسی^{۱۵})، رشد و میزان ویتامین های بافت در ماهی قزل آلاي رنگين کمان بررسی نمودند. در این بررسی از سه سطح متفاوت اکسیژن محلول (هایپرکسی، هیپوکسی، نرمال اکسی^{۱۶}) و در سه میزان متفاوت اسید آسکوربیک ۱۰، ۱۰۰، ۱۰۰۰ میلی گرم در کیلو گرم استفاده موده بودند. این بررسی نشان داد جیره های غذایی حاوی ویتامین C تاثیرات مثبتی در رشد در شرایط هیپوکسی و نرمال اکسی دارد و همچنین در شرایط هایپرکسی باعث سرعت بخشیدن در تنزل اسید آسکوربیک بافت می شود.

در سال ۲۰۰۴، Aras-hisar و همکارانش تاثیر ویتامین E در فعالیت آنزیم G6PD^{۱۷} در اریتروسیت ماهی قزل آلاي رنگين کمان در شرایط آزمایشگاهی و طبیعی بررسی نمودند. این بررسی ها نشان داد بعد از یک ساعت از تزریق ویتامین E فعالیت G6PD در شرایط طبیعی و در مقابل نور به میزان قابل توجهی کاهش یافته و محدود می شود اما در شرایط آزمایشگاهی تزریق ویتامین E باعث فعال شدن G6PD می شود.

در سال ۲۰۰۴، Yildiz شاخص های رشد و کیفیت فیله را در ماهی قزل آلاي رنگين کمان که توسط جیره هایی متشکل از مقادیر متفاوت از ویتامین E تغذیه شده بودند ، بررسی نمود. در این بررسی مقادیر متفاوت آلفا توكوفرول استات (۱۰۰، ۳۰۰، ۵۰۰) میلی گرم در کیلو گرم غذا به جیره ها اضافه گردید. در این بررسی که به مدت ۵۸ روز به طول انجامید تاثیر معنی داری در میزان رشد ویژه و شاخص های محیطی دیده نشد. اما ضریب تبدیل غذایی در ماهی هایی که توسط جیره غذایی شامل ۳۰۰ تا ۵۰۰ میلی گرم ویتامین E بودند به میزان قابل توجهی افزایش داشت و جیره های غذایی شامل ۱۰۰ میلی گرم ویتامین E کمترین میزان ضریب تبدیل غذایی را داشته اند. در نتیجه افزایش ویتامین E در غذا تجمع چربی در فیله و در کل بدن ماهی ارتقا یافت. نتایج این بررسی نشان داد با میزان بالاتر ویتامین E ، FCR بهتری داشته و همچنین کیفیت فیله گوشت ماهی نیز در آنها بالاتر می باشد.

در سال ۲۰۰۴، طاهر نیا تاثیر افزودن ویتامین C بر میزان رشد ، ضریب تبدیل غذایی و میزان بقای ماهی قزل آلاي رنگين کمان سه گرمی بررسی نمود. در این تحقیق از دو تیمار شامل ۰ و ۵۰۰ mg/kg ویتامین C

^{۱۴} hypoxia

^{۱۵} hyperoxia

^{۱۶} normoxia

^{۱۷} Glucose-6-phosphate dehydrogenase

برای مدت ۳۰ روز استفاده شد. در نتیجه این بررسی میزان رشد طولی و میانگین وزن در تیماری که شامل ویتامین C بود به طور قابل ملاحظه‌ای افزایش داشت. همچنین ضریب تبدیل غذایی که شامل ویتامین C بود نسبت به تیمار فاقد ویتامین افزایش چشمگیری داشت.

در سال ۲۰۰۷، Affonso و همکارانش اثر استفاده از ویتامین های E و C را در فاکتورهای خونی (*Arapaima gigas*) بررسی کردند. آنها در بررسی خود از ۷ تیمار (تیمار شاهد، ۳ تیمار شامل ۵۰۰، ۱۲۰۰، ۸۰۰، ۵۰۰ میلیگرم ویتامین C و ۳ تیمار شامل ۱۲۰۰، ۸۰۰، ۵۰۰ میلیگرم ویتامین E) استفاده نمودند. نتایج بررسی آنها نشان داد بالا بردن میزان ویتامین E تاثیری در تعداد گلبول های سفید خون ندارد، اما بالا بردن ویتامین C و یا ویتامین E باعث افزایش تعداد گلبول های قرمز و میزان هماتوکریت این گونه می شود.

در سال ۲۰۰۷، Gammanpila و همکارانش اثر مکمل های ویتامین E، C و Zinc را در تولید مثل ماهی تیلاپپای نیل بررسی نمودند و به این نتیجه رسیدند که استفاده از این سه مکمل باعث بالا رفتن دفعات تخم‌ریزی، بالا رفتن میزان کل تولید تخم، ارتقاء فکاندیتی، سرعت تخمه‌گشایی، تحرک اسپرم و دوام اسپرم اینگونه می‌شود.

در سال ۲۰۰۷، Li و همکارانش در تحقیقات خود اعلام نموده اند که افزایش ویتامین C به میزان ۱۳۵ میلیگرم بر کیلوگرم غذا سرعت رشد را در ماهیان آزاد پرورشی اقیانوس اطلس افزایش داده است. همچنین سرعت سنتز کلاژن در این ماهیان نسبت به تیمار شاهد بیشتر بوده است.

در سال ۲۰۰۷، Rainis و همکارانش تاثیر ویتامین E و فسفاتیدیل کولین را در کمیت و کیفیت اسپرم قزل‌آلای رنگین کمان بررسی نمودند. در این بررسی از تیمار شاهد، تیمار شامل ویتامین E، تیمار شامل فسفاتیدیل کولین و تیمار چهارم شامل ویتامین E و فسفاتیدیل کولین استفاده شد. در نتیجه این بررسی تیمار شامل ویتامین E به تنهایی، بالاترین میزان حجم نسبی اسپرم و تیمار شامل ترکیب فسفاتیدیل کولین و ویتامین E کمترین حجم نسبی اسپرم را داشتند. در مورد تراکم نسبی اسپرم نیز تیمار شامل ویتامین E بالاترین میزان تراکم اسپرم و تیمار ترکیبی کمترین تراکم اسپرم را داشتند.

در سال ۲۰۰۷، Trenzado و همکارانش اثر استفاده از ویتامین E, C و HUFA را در عملکرد ماهی قزل‌آلای رنگین‌کمان در شرایط متراکم پرورشی بررسی نمودند. در این بررسی از ویتامین E به مقدار (۲۵/۶ و ۲۷۵/۶ میلی‌گرم در کیلوگرم غذا) و ویتامین C (۰ و ۱۰۰۰ میلی‌گرم در کیلوگرم غذا) و HUFA (۳۰/۵ و ۱۲/۵ گرم در کیلوگرم غذا) استفاده شد. نتایج بررسی نشان داد میزان کورتیزول پلاسما نمی‌تواند معیار خوبی برای سنجش استرس مزمن در ماهی باشد. از آنجاییکه ماهی قزل‌آلای می‌تواند HUFA را سنتز کند، کم کردن HUFA در جیره غذایی باعث بالا رفتن مقاومت در برابر استرس در شرایط متراکم پرورش می‌باشد. بالاترین میزان مقاومت در برابر استرس تراکم، در ماهی‌هایی دیده شد که از میزان ویتامین E بیشتری در غذای خود برخوردار بودند.

در سال ۲۰۰۸، Canyurt and Akhan تأثیر ترکیبات اسید آسکوربیک را در کیفیت اسپرم قزل‌آلای رنگین‌کمان بررسی نمودند. در این بررسی دو تیمار مختلف یکی ۳۰۰ میلی‌گرم در کیلوگرم غذا و دیگری ۸۰۰ میلی‌گرم در کیلوگرم غذا ویتامین C به غذای ماهی اضافه شد. میزان باروری، اسپرماتوکریت و میزان فعالیت اسپرم و غلظت اسپرم در ماهیانی که توسط جیره غذایی حاوی ۸۰۰ میلی‌گرم در کیلوگرم غذا تغذیه شده بودند به میزان قابل توجهی بالاتر و بهتر بود.

در سال ۲۰۰۸، Lenient و همکارانش با بررسی تأثیر سطوح مختلف ویتامین E جیره (۰، ۲۵، ۵۰، ۷۵، ۱۰۰، ۱۲۵ و ۱۵۰ میلی‌گرم در کیلوگرم) بر رشد بچه ماهیان انگشت قد (*Heterobranchus longifilis*) دریافتند که شاخص ضریب رشد ویژه در ماهیانی که با جیره حاوی ۵۰ میلی‌گرم در کیلوگرم ویتامین E تغذیه شدند، نسبت به جیره فاقد مکمل و سایر تیمارها بیشتر بود. البته این اختلاف نسبت به گروه شاهد و گروه‌های دیگر تغذیه شده با سطوح دیگر ویتامین E معنی‌دار نبود.

در سال ۲۰۰۹، اکبری و همکارانش اثر استفاده از ناپلیوس آرتمیای غنی شده با اسیدهای چرب غیر اشباع بلندزنجیره و ویتامین C را در میزان رشد و بقا لاروهای قزل‌آلای رنگین‌کمان بررسی نمودند. در این بررسی لاروهای قزل‌آلای به مدت ۳ هفته توسط آرتمیای غنی شده تغذیه شدند. در نتیجه این بررسی بیشترین میزان رشد و بقا در لاروهایی دیده شد که از آرتمیای غنی شده با ویتامین C و اسیدهای چرب غیر اشباع تغذیه شده بودند.

در سال ۲۰۱۰، تاتینا و همکارانش تأثیر جیره‌های غذایی حاوی سطوح مختلف ویتامین C و E بر میزان گلبول‌های قرمز خونی ماهی استرلیاد پرورشی (*Acipenser ruthenus*) را مورد مطالعه قرار دادند. جیره‌هایی شامل ۰، ۱۰۰، ۴۰۰ میلی‌گرم در کیلوگرم غذا ویتامین C و ۰، ۱۰۰، ۴۰۰ میلی‌گرم در کیلوگرم غذا ویتامین E در این بررسی مورد استفاده قرار گرفتند. نتایج آنالیز خونی ماهیان بعد از آزمایش نشان داد، ماهیانی که از جیره غذایی حاوی ۱۰۰ میلی‌گرم در کیلوگرم غذا ویتامین E و ۰ میلی‌گرم در کیلوگرم غذا ویتامین C تغذیه شده‌اند بیشترین میزان گلبول قرمز و کمترین میزان گلبول قرمز مربوط به تیمار شاهد بوده است.

فصل سوم:

روش اجرای تحقیق

۳-۱- محل انجام تحقیق

این تحقیق در مزرعه پرورش ماهی قزل آلا (مرزن قزل) واقع در مرزن آباد (کلاردشت مازندران) انجام پذیرفت (شکل ۳-۱). برای این منظور تعداد ۶۳۰۰ عدد بچه ماهی قزل آلا رنگین کمان با میانگین وزنی ۱۷ گرم در ۷ استخر $10 \times 1 \times 1$ متر (شکل ۳-۲) به مدت ۶۰ روز نگهداری شدند. هر استخر به عنوان یک تیمار توسط تور فلزی به سه قسمت تقسیم شد که به این ترتیب هر استخر شامل سه تکرار از یک تیمار بود به طور میانگین در هر تکرار ۳۰۰ عدد بچه ماهی قرار گرفت. مقدار غذای روزانه هر گروه از بچه ماهیان با توجه به دمای متوسط آب استخرها و با استفاده از جداول تغذیه ای مربوطه تعیین و در ۴ نوبت به صورت دستی در اختیار آنها قرار گرفت.

لازم به ذکر است، در مزرعه مرزن قزل که تحقیق فوق در آن انجام پذیرفته، برای تامین اکسیژن مورد نیاز آب از یک دستگاه تزریق اکسیژن با قدرت تولید ۲۰-۱۸ کیلوگرم اکسیژن در ساعت با خلوص ۹۵-۹۳ درصد استفاده می شود.



(شکل ۳-۱) مزرعه مرزن قزل آلا واقع در مرزن آباد (مازندران)



(شکل ۳-۲) نمای استخرهای تبیین شده

(جدول ۳-۱) جیره های غذایی تیمارهای آزمایشی به تفکیک میزان ویتامین های اضافه شده

ردیف	تیمار
۱	غذای اکستروود به اضافه ۵۰ میلی گرم ویتامین C به ازای هر کیلوگرم غذا
۲	غذای اکستروود به اضافه ۱۰۰ میلی گرم ویتامین C به ازای هر کیلوگرم غذا
۳	غذای اکستروود به اضافه ۵۰ میلی گرم ویتامین E به ازای هر کیلوگرم غذا
۴	غذای اکستروود به اضافه ۱۰۰ میلی گرم ویتامین E به ازای هر کیلوگرم غذا
۵	غذای اکستروود به اضافه ۵۰ میلی گرم ویتامین C و ۵۰ میلی گرم ویتامین E به ازای هر کیلوگرم غذا
۶	غذای اکستروود به اضافه ۱۰۰ میلی گرم ویتامین C و ۱۰۰ میلی گرم ویتامین E به ازای هر کیلوگرم غذا
۷	تیمار شاهد شامل غذای اکستروود بدون هر گونه افزودنی

۳-۲- غذا

در این تحقیق برای تغذیه ماهی ها از غذای اکستروود Skretting محصول کشور ایتالیا استفاده شد. از آنجائیکه وزن بچه ماهی ها در ابتدا ۱۷ گرم بود برای شروع طبق جدول غذایی باید از Select BE P1 برای تغذیه آنها استفاده می شد که به طور معمول برای سایز ۱۵ تا ۸۰ گرم از آن استفاده می شود. میزان غذادهی طبق دستورالعمل کارخانه تولید کننده و با توجه به درجه حرارت و وزن ماهی با استفاده از فرمول زیر انجام پذیرفت.

تعداد ماهی \times وزن متوسط ماهی (گرم) $\times N$ = میزان غذادهی روزانه (گرم)

N = ضریبی که با توجه به درجه حرارت در جدول ارائه شده کارخانه تولید کننده تعیین شده است و به صورت درصد بیان میشود.

به این صورت از آنجاییکه در ابتدای انجام پروژه وزن ماهی ها ۱۷ گرم و درجه حرارت ۱۰ درجه سانتیگراد و ضریب N برابر ۱/۵٪ در جدول غذادهی تعیین شده بود. غذادهی به هر تکرار به میزان روزانه ۷۵ گرم آغاز گردید و در هفته سوم این میزان به ۱۰۰ گرم افزایش یافت به همین ترتیب غذادهی در هفته پنجم ۱۳۰ گرم و هفته هفتم ۱۶۰ گرم در روز انجام پذیرفت.

(جدول ۳-۲) ترکیب غذای مورد استفاده

پروتئین	۴۵٪
چربی	۲۰٪
خاکستر	۹٪
فیبر	۱۵٪
رطوبت	۹٪

۳-۳- ویتامین E

ویتامین E به صورت آلفاتوکوفرول استات، که شکلی از ویتامین E است که برای غذادهی به ماهیان استفاده می شود (Anderson & Sunderland, 2002) تهیه و به میزان معین به هر یک از جیره های غذایی اضافه گردید. از آنجاییکه این ویتامین محلول در چربی است میزان مورد نظر ابتدا در محلول لیستین حل و بعد روی غذا اسپری گردید. لازم به ذکر است میزان غذای لازم برای هر تیمار به صورت روزانه تهیه شد. ویتامین E مورد مصرف در این تحقیق ۱۰۰٪ خالص و محصول شرکت Merck آلمان بود.

۳-۴- ویتامین C

این ویتامین به شکل اسید اسکوربیک برای ماهیان استفاده می شود اما از آنجایی که اسید اسکوربیک محلول در آب می باشد و به منظور جلوگیری از هدر رفتن آن در آب در این تحقیق از ویتامین C به شکل آسکوربیل پالمیتات که قابل انحلال در چربی است استفاده شد.

آسکوربیل پالمیتات منبع خوبی جهت تغذیه ماهیان بوده و قابلیت دسترسی مناسبی دارد زیرا این مشتق فسفات‌ه اسید آسکوربیک، دارای جذب و تجمع بافتی مناسبی در بسیاری از ماهیان می باشد. همچنین آسکوربیل پالمیتات از پایداری مناسبی در طی فرایند فرآوری و ذخیره سازی غذا برخوردار است و فعالیت زیستی بالاتری در مقایسه با سایر مشتقات اسید آسکوربیک اسید دارد (Sandnes and Waagbø *et al.*, 1993; Waagbø, 1991). در این تحقیق از ویتامین C (با درجه خلوص ۱۰۰٪) محصول شرکت Merck آلمان استفاده گردید. روش اضافه نمودن ویتامین C به غذا مشابه ویتامین E می باشد. به این ترتیب که میزان مورد نظر بعد از اندازه گیری داخل لیستین حل و به روی جیره غذایی اسپری شد.

۳-۵- تجزیه لاشه

۳-۵-۱- اندازه گیری درصد رطوبت

در پایان هفته هشتم، برای تعیین ترکیبات لاشه تعداد ۶ قطعه ماهی از هر تکرار به صورت تصادفی انتخاب و درون یخ به آزمایشگاه منتقل شد. نمونه ها در آزمایشگاه در فریزری با دمای ۲۰- درجه سانتیگراد نگهداری شدند. برای تعیین ترکیبات لاشه ۵ گرم از فیله گوشت جدا و آب سطحی آن خشک گردید. فیله مورد نظر درون پتری دیش و به مدت ۲۴ ساعت در آون (۱۰۵ درجه سانتی گراد) قرار گرفته و در هاون چینی به شکل پودر در آمد سپس با محاسبه اختلاف وزن تر و خشک نمونه ها درصد رطوبت آنها محاسبه گردید (AOAC, 1990).

۳-۵-۲- اندازه گیری درصد چربی

برای تعیین میزان چربی بر اساس روش سوکسله^{۱۸} میزان ۵ گرم از فیله جدا و همراه با کاغذ صافی توزین و سپس به مدت ۲۴ ساعت در آون ۱۰۵ درجه سانتی گراد قرار گرفت. سپس نمونه ها به دسیکاتور منتقل شده تا سرد شوند. بعد از توزین نمونه ها در کارتوش دستگاه سوکسله و داخل بالن قرار می گیرند. ۱۵۰ میلی لیتر N-hexan به آن اضافه گردیده سپس دستگاه به مدت ۹۰ دقیقه روشن شد در ادامه با قرار دادن بالن در دمای ۷۰ درجه سانتیگراد به مدت ۲ ساعت هگزان باقیمانده جدا و سپس بالن بعد از خنک شدن توزین شد (AOAC, 1990).

میزان چربی نمونه ها بر اساس فرمول زیر تعیین می شود که در آن W_1 برابر با وزن بالن خالی (گرم)، W_2 برابر وزن بالن به علاوه چربی (گرم)، W_3 برابر با وزن نمونه (گرم):

^{۱۸} Soxhlet

$$FAT(\%) = \frac{W_2 - W_1}{W_3} \times 100 \quad (AOAC, 1990)$$

۳-۵-۳- اندازه گیری درصد پروتئین

برای تعیین میزان پروتئین به روش کلدال^{۱۹} عمل شد (AOAC, 1990). ابتدا ۵ گرم از فیله جدا و به مدت ۲۴ ساعت در دمای ۱۰۵ درجه سانتیگراد قرار گرفته و بعد از سرد شدن در دیسکاتور توزین شد. سپس نمونه ها به داخل لوله های آزمایش دستگاه، حاوی ۳ گرم کاتالیست پروتئین و ۲۰ میلی لیتر اسید سولفوریک در دمای ۲۵۰ درجه سانتی گراد منتقل شد. زمانیکه محتویات بالن به رنگ سبز درخشان در می آید یعنی به طور کامل هضم شده اند پس در این مرحله باید آنها را به دستگاه تقطیر کجدال منتقل و ۴۰ میلی لیتر سود سوز آور به آرامی به آن اضافه نمود تا رنگ محلول به ارغوانی تغییر کند. تقطیر تا زمانی ادامه می یابد که حجم محلول به ۳۰۰ میلی لیتر برسد و رنگ محلول سیاه شود. در طرف دیگر دستگاه مقدار ۵۰ میلی لیتر اسید بوریک ۲ درصد همراه با چند قطره نشانگر متیلن رد داخل ارلن ریخته تا محلول به رنگ صورتی در آید و سپس ارلن زیر قطره چکان قرار می گیرد تا رنگ آن از صورتی به بنفش تغییر یابد. سپس محلول موجود در ارلن را با اسید هیدروکلریک ۰,۱ نرمال تیترا نموده تا به رنگ صورتی برسد. به محض رویت رنگ صورتی تیتراسیون قطع و میزان اسید مصرفی را یادداشت کردیم. محاسبه میزان پروتئین با استفاده از فرمول زیر انجام می پذیرد (AOAC, 1990).

$$\text{درصد نیتروژن} = \frac{14 \times 100 \times \text{حجم اسید مصرفی} \times \text{نرمالیت اسید}}{\text{وزن نمونه (گرم)} \times 1000}$$

فاکتور پروتئینی \times درصد نیتروژن = درصد پروتئین

۳-۵-۴- اندازه گیری میزان خاکستر

برای اندازه گیری میزان خاکستر، ۵ گرم نمونه را در کوره الکتریکی برای ۴۸ ساعت در دمای ۵۵۰ درجه سانتی گراد قرار داده و بعد از خنک شدن نمونه بدست آمده به دقت توزین می شود. سپس با استفاده از فرمول زیر میزان خاکستر هر نمونه تعیین می شود (AOAC, 1990).

$$Ash = \frac{M_2 - M_1}{m_0} \times 100$$

M_0 برابر است با وزن ابتدایی نمونه (گرم)

M_1 برابر است با وزن بوته چینی (گرم)

M_2 برابر است با مجموع بوته چینی و خاکستر (گرم)

^{۱۹} Kjeldahl

۳-۶- آنالیز میزان ویتامین C در جیره های غذایی

برای تعیین میزان ویتامین C در جیره های غذایی آماده شده طبق روش Hsu و Shiau (1999) عمل شد. به این صورت که میزان ۱-۳ گرم از هر جیره غذایی (بعد از آماده شدن و ترکیب با ویتامین) کاملاً خورد شده سپس با ۲۵ میلی لیتر کلروفرم، ۳۰ میلی لیتر اسید فسفریک ۵ درصد (۱۲ ppm) Dithithreitol به مدت ۲۵ دقیقه کاملاً مخلوط گشته و مخلوط به دست آمده برای مدت ۲۵ الی ۳۰ دقیقه به همان صورت دست نخورده باقی ماند. سپس ۳۰ میلی لیتر از محلول فوقانی برداشته و سانتریفیوژ گردید. سپس ماده به دست آمده از فیلتر سرنگی ۰/۲ میکرومتری عبور داده شد و میزان اسید آسکوربیک توسط دستگاه کروماتوگرافی^{۲۰} (HPLC) مجهز به ستون C18 تعیین گردید. لازم به ذکر است دستگاه HPLC شامل یک فاز متحرک KH_2PO_4 با غلظت ۰/۵ مولار و سرعت جریان ۰/۶ میلی لیتر در دقیقه و در PH برابر با ۳ تنظیم گردید. مایع خروجی بعد از خروج توسط اشعه UV پالایش گردید. در ضمن برای تزریق غلظت های استاندارد اسیدآسکوربیک از نمونه های شرکت SAMP محصول کشور چین استفاده شد به این صورت که این غلظت ها قبل از نمونه اصلی به دستگاه تزریق شدند.

۳-۷- بررسی های زیست سنجی

در طول این تحقیق در ۵ مرحله ماهی ها مورد زیست سنجی قرار گرفتند و در هر مرحله وزن و طول ۵۰ نمونه از هر تکرار با دقت مورد اندازه گیری قرار گرفت (Wang et al., 2005). اولین زیست سنجی قبل از شروع تحقیق صورت پذیرفت به این شکل که تعداد ۵۰ عدد ماهی از هر تکرار به صورت اتفاقی انتخاب و توسط ترازوی دیجیتال با دقت ۰,۰۱ گرم و خط کش بیومتری با دقت ۱ میلی متر مورد زیست سنجی قرار گرفتند. مراحل بعدی زیست سنجی نیز به فاصله هر ۱۵ روز یک بار به همین شکل صورت پذیرفت (Wang et al., 2005).

۳-۸- بررسی شاخص های خونی

۳-۸-۱- خونگیری

در پایان هفته هشتم عملیات خونگیری برای اندازه گیری فاکتور های خونی صورت پذیرفت. برای این منظور از هر تکرار تعداد ۱۰ عدد ماهی به صورت تصادفی انتخاب و توسط عصاره گل میخک بیهوش گردیدند. سپس عمل خونگیری توسط سرنگ ۱ سی سی از قلب صورت گرفت، لازم به ذکر است خون

^{۲۰} High Performance liquid Chromatography

داخل هر سرنگ به لوله های اپندرف آغشته به ماده ضد انعقاد خون (هپارین) منتقل و برای انجام مطالعات هماتولوژیک سریعاً به آزمایشگاه (مرکز تحقیقات نوشهر) ارسال گردید. شمارش گلبول ها توسط لام هموسیتومتر انجام پذیرفت. برای این منظور مجموع اعداد ۵ خانه در دو قسمت لام به دقت شمارش و با هم جمع گردید و میانگین اعداد را در ۱۰۰۰۰ ضرب نمودیم. در نتیجه تعداد گلبول ها بر حسب تعداد در میلیتر مکعب به دست آمد.

۳-۸-۲- شمارش گلبول های قرمز RBC

برای شمارش گلبول های قرمز با استفاده از پیت ملانژور تا درجه ۰,۵ پیت خون برداشته و با استفاده از محلول رقیق کننده (نات هریکس)^{۲۱} به نسبت ۱:۲۰۰ رقیق گردید. برای اینکه محلول بصورت کاملاً یکنواخت در آید آن را برای چند دقیقه روی همزن قرار داده سپس یک قطره خون روی لام هموسیتومتر قرار داده شد. مجموع ۵ خانه از لام هموسیتومتر زیر میکروسکوپ نوری با بزرگنمایی ۴۰ شمارش و تعداد نهایی در عدد ۱۰۰۰۰ ضرب و در نتیجه تعداد گلبول های قرمز بر اساس تعداد در هر میلی لیتر مکعب بیان شد (تاتینا، ۱۳۸۸).

۳-۸-۳- شمارش گلبول های سفید WBC

برای شمارش گلبول های سفید با استفاده از پیت ملانژور تا درجه ۰,۵ پیت خون برداشته و با استفاده از محلول رقیق کننده (نات هریکس) به نسبت ۱:۲۰ رقیق گردید. برای اینکه محلول بصورت کاملاً یکنواخت در آید آن را برای چند دقیقه روی همزن قرار داده و سپس یک قطره از خون روی لام هموسیتومتر قرار داده و سپس تعداد گلبول های موجود در ۴ مربع زیر میکروسکوپ نوری با بزرگنمایی ۴۰ بررسی شد و تعداد گلبول های سفید بر حسب تعداد در میلی متر مکعب از خون طبق فرمول زیر محاسبه شد (سیمپسون، ۱۹۹۵).

$$\frac{20 \times \text{تعداد های گلبول شمارش شده}}{4 \times 0.1} = 50 \times \text{تعداد های گلبول سفید شمارش شده}$$

۳-۸-۴- اندازه گیری هماتوکریت

هماتوکریت نشان دهنده نسبت حجم گلبول های قرمز به حجم کل خون می باشد. برای این منظور لوله های میکروهماتوکریت وارد لوله های اپندورف حاوی خون هپارینه گردید به صورتیکه به نسبت ۲ به ۳ از لوله

میکروهماتوکریت از خون پر شود. پس از مسدود کردن لوله‌ها با خمیر، سانتریفیوژ انجام شد (شکل ۳-۳). سانتریفیوژ لوله‌های مویین خون به مدت ۱۰ دقیقه با دور ۳۰۰۰ صورت گرفت. سپس نمونه‌ها روی خط کش هماتوکریت به شکلی قرار گرفت که قسمت بالایی پلاسما با خط ۱۰۰ درصد و انتهای پایینی سلول‌های قرمز با خط درصد مشخص شود. سپس حجم سلول‌های قرمز را خوانده با تقسیم این عدد بر ۱۰۰ میزان هماتوکریت بر حسب لیتر بر میزان لیتر خون محاسبه می‌شود (شاهسونی، ۱۳۷۸).



(شکل ۳-۳) دستگاه سانتریفیوژ و سنجش درصد هماتوکریت خون

۳-۸-۵- شمارش افتراقی گلبول‌های سفید

برای تعیین تعداد هر نوع از گلبول‌های سفید از جمله لنفوسیت، مونوسیت، بازوفیل، نوتروفیل و ائوزینوفیل باید گسترش خونی تهیه شود. برای این منظور ابتدا یک قطره از خون هپارینه روی گوشه لام قرار گرفته و سپس با یک لام دیگر با زاویه ۴۰ درجه روی لام گسترده می‌شود. گسترش به دست آمده بعد از خشک شدن در الکل اتانول ۹۵ درصد فیکس شده و بعد از خشک شدن رنگ آمیزی می‌شود. رنگ آمیزی به روش گرانوالد-گیمسا انجام پذیرفت برای این منظور لام‌ها به روی یک ریل به حالت افقی داخل محلول مای‌گرانوالد^{۲۲} قرار گرفتند تا رنگ تمام سطح آنها را بپوشانند. بعد از ۵ دقیقه لام‌ها شسته و در مرحله بعد محلول گیمسا^{۲۳} روی لام ریخته شد تا تمام سطح آن را بپوشانند. لام‌ها به مدت ۱۵ تا ۲۰ دقیقه در همین وضعیت باقی مانده و بعد شسته شده، به حالت عمودی قرار گرفتند تا خشک شوند. در ادامه لام‌ها زیر میکروسکوپ با دقت ۱۰۰ بررسی تعداد ۱۰۰ عدد از گلبول‌ها شمرده و تعداد هر یک از آنها به صورت درصد بیان شد (تاتینا، ۱۳۸۸).

^{۲۲} May-Grunwald
^{۲۳} Giemsa

۳-۸-۶- اندازه‌گیری هموگلوبین

برای تعیین میزان هموگلوبین طبق روش سیان مت هموگلوبین^{۲۴}، ابتدا ۱۰ میلی‌لیتر محلول درابکین^{۲۵} در لوله آزمایش ریخته و ۲۰ میکرولیتر از خون به آن اضافه می‌شود. لوله‌ها به مدت ۵ دقیقه روی همزن قرار گرفته تا محلول و خون کاملاً مخلوط شوند. سپس با استفاده از دستگاه طیف سنج در طول موج ۵۴۰ نانومتر عدد ABS تعیین و با استفاده از فرمول زیر میزان هموگلوبین بر اساس گرم در دسی‌لیتر محاسبه و تعیین گردید (Bilen et al., 2011).

$$\text{میزان هموگلوبین} = \text{ABS} \times 36/8$$

۳-۸-۷- تهیه سرم خون

برای تهیه سرم خون تعداد ۱۲ عدد ماهی از هر تکرار به صورت کاملاً تصادفی انتخاب شدند. نمونه‌ها در سطلی که توسط آب همان استخر پر شده بود نگهداری و سپس در معرض استرس حرارتی قرار گرفتند. بدین صورت که هر کدام از ماهی‌ها برای مدت ۵ دقیقه در آبی که ۵ درجه سانتی‌گراد گرمتر از آب استخر بود قرار گرفتند (تا کامی، ۱۳۸۲) بعد از مواجهه با استرس، به روش قطع پایه دمی میزان ۰,۵ سی سی خون از هر نمونه گرفته شد و داخل لوله‌های آزمایشگاهی منتقل گردید. لوله‌های حاوی خون بلافاصله در سرعت ۳۰۰۰ دور در دقیقه برای مدت زمان ۱۰ دقیقه سانتریفیوژ گردید و سرم خون جدا شد. سرم بدست آمده را می‌توان تا زمان انجام آزمایش در دمای ۲۰- درجه سانتی‌گراد نگهداری نمود. آماده‌سازی سرم خون طبق روش ژانگ و همکاران ۲۰۰۷ انجام پذیرفت بدین صورت که پس از یخ‌زدایی با استفاده از آب دیونیزه به نسبت ۱ به ۲ (سرم به آب) رقیق سازی انجام پذیرفت (Bilen et al., 2011).

۳-۹- اندازه‌گیری کورتیزول

اندازه‌گیری میزان غلظت کورتیزول در سرم خون، به روش ELISA انجام پذیرفت. برای این منظور از کیت‌های Accubind ساخت شرکت Monobind استفاده گردید (Kopp, 2011).

^{۲۴} cyanmethemoglobin
^{۲۵} Drabkin

۳-۱۰- اندازه‌گیری گلوکز

اندازه‌گیری میزان غلظت گلوکز در سرم خون ماهیان، به روش Auto analyzer مدل Alpha-6 و با استفاده از کیت‌های شرکت Man انجام پذیرفت (Kopp, 2011).

۳-۱۱- بررسی درصد بقاء بچه ماهیان قزل آلا^{۲۶} (SR)

با شمارش روزانه تعداد تلفات ماهیان قزل آلا^{۲۶} رنگین کمان در طول دوره پرورش در تیمارهای مختلف درصد بقا از روز اول تا روز شصتم با توجه به معادله زیر محاسبه شد (Wang et al., 2005).

$$SR(\%) = \frac{N_2}{N_1} \times 100$$

تعداد ماهی زنده = n_2 ، تعداد ماهی اولیه = n_1 ، درصد بقاء = Mortality %.

۳-۱۲- شاخص وضعیت^{۲۷} (CF)

بررسی شاخص وضعیت (ضریب چاقی) با استفاده از وزن و طول بر حسب گرم و سانتی متر بر اساس فرمول زیر انجام پذیرفت (Hung and Lutes, 1987).

$$CF = \frac{W \times 100}{L^3}$$

۳-۱۳- ضریب تبدیل غذایی (FCR)

ضریب تبدیل غذایی یا^{۲۸} (FCR)، مقدار غذای مورد نیاز بر حسب واحد وزن برای اضافه شدن یک واحد به وزن موجود زنده می باشد. این شاخص از طریق تقسیم میزان غذای مصرفی در طول دوره بر میزان افزایش وزنی حاصله محاسبه می شود (AOAC, 1990).

$$FCR = \frac{\text{میزان غذای مصرفی}}{\text{میزان افزایش وزنی}}$$

Servival rate^{۲۶}
Conditional factor^{۲۷}
Food Conversion Ratio^{۲۸}

۳-۱۴- نسبت بازده پروتئین^{۲۹} (PER)

نسبت بازده پروتئین، به معنی میزان وزن اضافه شده (گرم) به میزان پروتئین مصرفی (گرم) می باشد. این شاخص با استفاده از فرمول زیر محاسبه می گردد.

$$PER = \frac{\text{وزن اضافه شده}}{\text{میزان پروتئین مصرفی}} \quad (\text{Sotoudeh et al., 2010})$$

۳-۱۵- نرخ رشد ویژه^{۳۰} (SGR)

برای محاسبه نرخ رشد ویژه از فرمول زیر استفاده شد. در این فرمول W_2 وزن ثانویه (گرم) و W_1 وزن ابتدایی (گرم) ماهی می باشد.

$$SGR(\%DAY - 1) = \left(\frac{\log W_2 - \log W_1}{t} \right) \times 100 \quad (\text{Kumari and Sahoo, 2005})$$

۳-۱۶- افزایش وزن^{۳۱} (WG)

وزن اضافه شده به بدن را، که بر حسب گرم است، از تفریق وزن ثانویه (W_2) بر حسب گرم از وزن اولیه (W_1) بر حسب گرم محاسبه می کنند.

$$WG (g) = W_2 - W_1 \quad (\text{Sotoudeh et al., 2010})$$

۳-۱۷- درصد میانگین رشد روزانه^{۳۲} (ADG)

برای اندازه گیری درصد میانگین رشد روزانه کفایت اختلاف وزن نهایی W_2 از وزن ماهی ابتدایی W_1 را در فرمول زیر قرار داده و با دانستن تعداد کل روزهای تحقیق این مقدار را محاسبه نمود.

^{۲۹} Protein Efficiency ratio
^{۳۰} specific growth rate
^{۳۱} Waight Gain
^{۳۲} Additional Daily Growth

$$ADG = \frac{(W2 - W1) \times 100}{W1} \times \text{Days} \quad (\text{AOAC, 1990})$$

۳-۱۸- درصد کارایی تبدیل غذا^{۳۳} (FCE)

کارایی تبدیل غذا با تقسیم میزان افزایش وزن به گرم بر میزان غذای استفاده شده از طریق فرمول زیر محاسبه می شود.

$$FCE = \frac{W2 - W1}{\text{Food}} \times 100 \quad (\text{AOAC, 1990})$$

۳-۱۹- درصد افزایش وزن

درصد افزایش وزن به معنی میزان وزن اضافه شده در مدت زمان تحقیق است و با استفاده از فرمول زیر محاسبه می شود.

$$\text{درصد افزایش وزن} = \frac{W2 - W1}{W1} \times 100 \quad (\text{Sotoudeh et al., 2010})$$

۳-۲۰- درصد ضریب رشد روزانه^{۳۴} (DGR)

درصد ضریب رشد روزانه به معنی میزان وزن کسب شده طی یک روز است که به صورت درصد و با استفاده از فرمول زیر محاسبه می شود.

$$DGR = \frac{W2 - W1}{\text{Days}} \times 100 \quad (\text{Sotoudeh et al., 2010})$$

۳-۲۱- بررسی کیفی آب

نمونه برداری از آب قبل از ورود به استخر و بعد از خروج از هر استخر به صورت روزانه انجام پذیرفت. فاکتورهای نیتريت، نیترات و آمونیاک در هر تیمار بررسی شد. فاکتورهای اکسیژن محلول PH و دما نیز به صورت روزانه همزمان بمنظور حفظ شرایط مطلوب زیستی ماهی اندازه گیری شد. در این بررسی سنجش غلظت فاکتورهای کیفی آب شامل نیتريت، نیترات و آمونیاک به ترتیب با کیت های Lamotte مدل های

^{۳۳} Food Conversion Efficiency
^{۳۴} Daily growth Rate

LM3352، LM3304 و LM7297 انجام شد. مقدار O₂ محلول آب و همچنین دمای آب توسط دستگاه تزریق اکسیژن به صورت اتومات روزانه اندازه گیری می شد که این مقادیر روزانه بر طبق داده های دستگاه یادداشت گردید. میزان PH آب نیز با استفاده از PH متر اندازه گیری گردید.

۳-۲۲- تجزیه و تحلیل آماری

برای تجزیه و تحلیل آماری از روش آنالیز واریانس یک طرفه^{۳۵} استفاده شد و مقایسه میانگین داده ها با کمک آزمون دانکن^{۳۶} انجام و وجود یا اختلاف معنی دار در سطح اعتماد ۹۵ درصد تعیین گردید. همچنین آنالیز داده ها با استفاده از نرم افزار آماری SPSS انجام گرفت (Wang *et al.*, 2005).

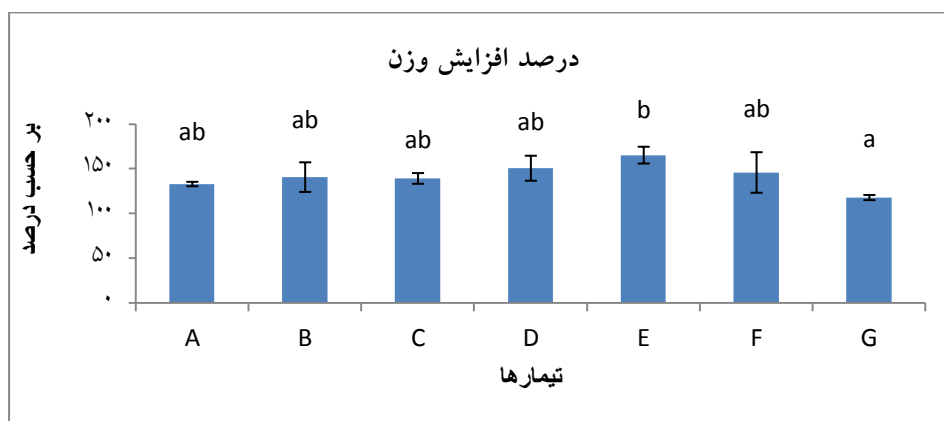
^{۳۵} one way ANOVA
^{۳۶} Duncan

فصل چهارم:

تجزیه و تحلیل داده ها

۴-۱- درصد افزایش وزن

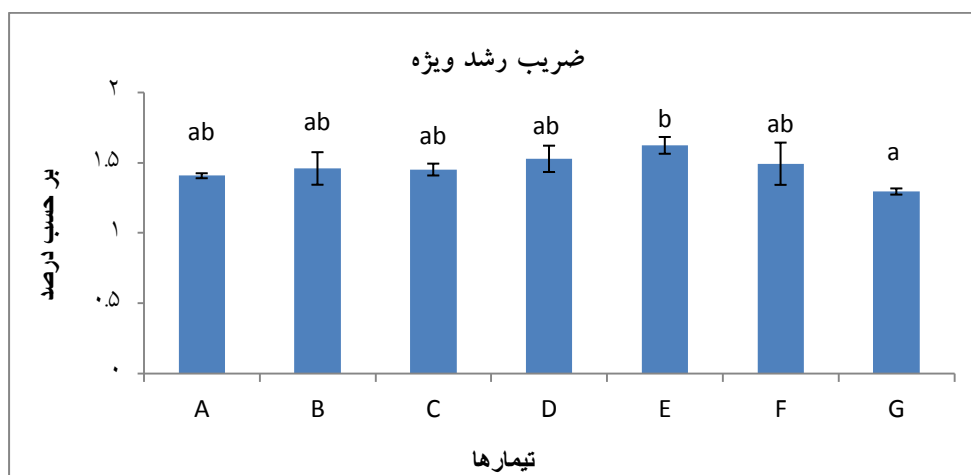
در این بررسی روند افزایش رشد از روز ۴۵ به بعد تغییر معنی‌داری را میان تیمارها نشان داد. به این صورت که ماهیان تیمارهای تلفیقی و تیمار D دارای بالاترین میزان افزایش وزن بودند اما تفاوت معنی‌داری بین این سه تیمار وجود نداشت ($P>0.05$). همچنین تیمارهای شاهد و تیمار C دارای کمترین میزان درصد افزایش وزن بودند. در ادامه روند رشد تا روز ۶۰ اختلاف معنی‌داری بین تیمارها دیده شد ($P<0.05$). بدین صورت که تیمار تلفیقی E دارای بالاترین میزان درصد افزایش وزن بود و اختلاف معنی‌داری با تیمار شاهد نشان داد (نمودار ۴-۱). همچنین تیمار شاهد و تیمارهای A و C دارای کمترین درصد افزایش وزن بودند. به طور کل ماهیان تیمار E که با استفاده از جیره غذایی تلفیقی ۵۰ میلی‌گرم ویتامین C و ۵۰ میلی‌گرم ویتامین E تغذیه شده بودند دارای بالاترین درصد افزایش وزن (۱۶۵/۰۴٪) و تیمار شاهد با (۱۱۷/۵٪) دارای کمترین درصد افزایش وزن بودند، اما اختلاف معنی‌داری بین تیمارهای حاوی ویتامین مشاهده نشد ($P>0.05$).



(نمودار ۴-۱) درصد افزایش وزن ($\text{min} \pm \text{S.D}$) تیمارهای آزمایشی در پایان هفته هشتم
(حروف مشابه بر روی هر یک از ستون‌ها بیانگر عدم اختلاف معنی‌دار بین تیمارها می‌باشد)

۲-۴- ضریب رشد ویژه

در این تحقیق اختلاف معنی داری در روند ضریب رشد ویژه از روز ۴۵ در بین تیمار های مختلف دیده شد ($P<0.05$) و در ادامه روند افزایش وزن تا روز ۶۰ نیز به همین شکل اختلاف معنی داری نشان داد. همانطور که در نمودار (۲-۴) مشخص شده است، تیمار تلفیقی E دارای بالاترین میزان ضریب رشد ویژه بود که اختلاف معنی داری با تیمار شاهد نشان داد ($P<0.05$). به طور کلی تیمار تلفیقی E با ۱,۶۲ درصد بالاترین میزان ضریب رشد ویژه و تیمار شاهد با ۱,۲۹ درصد کمترین میزان ضریب رشد ویژه را نشان دادند. تیمارهای حاوی ویتامین به غیر از تیمار E تفاوت معنی داری با تیمار شاهد نداشتند ($P>0.05$) اما ضریب رشد ویژه در تمامی تیمارهای حاوی ویتامین بالاتر از تیمار شاهد بود.

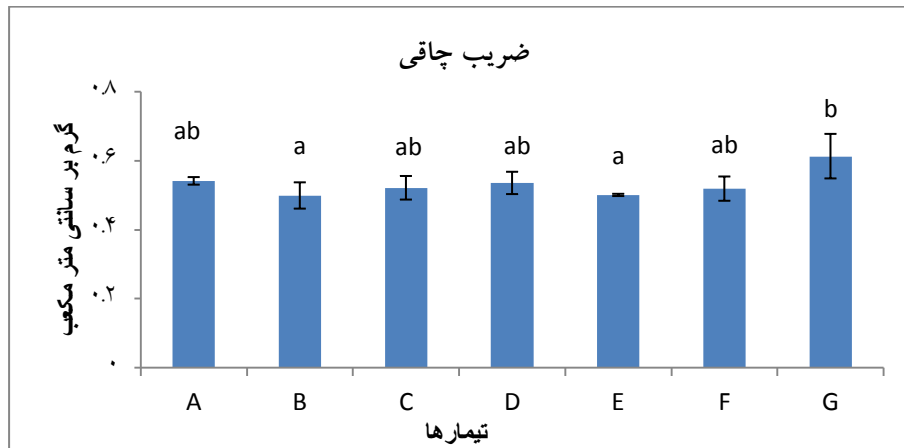


(نمودار ۲-۴) درصد ضریب رشد ویژه ($\text{min} \pm \text{S.D}$) تیمارهای آزمایشی در پایان هفته هشتم (حروف مشابه بر روی هر یک از ستون‌ها بیانگر عدم اختلاف معنی دار بین تیمارها می باشد)

۳-۴- ضریب چاقی

در پایان هفته هشتم و بررسی فاکتورهای رشد، همانطور که در نمودار (۳-۴) مشاهده می شود، اختلاف معنی داری در روند ضریب چاقی بین تیمارها دیده شد ($P<0.05$). به این صورت که تیمار شاهد به طور معنی داری نسبت به تیمار تلفیقی E و تیمار B بالاترین ضریب چاقی را نشان داد. به طور کلی تیمار شاهد با ۰,۶۲ گرم بر سانتیمتر مکعب، بالاترین میزان ضریب چاقی و تیمار تلفیقی E و تیمار B به ترتیب با ۰,۵ و

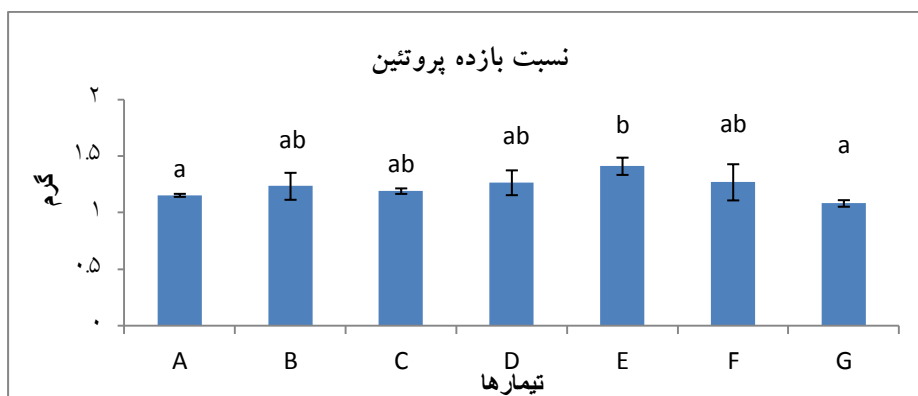
۰,۴۹ گرم بر سانتی متر مکعب، کمترین میزان را نشان دادند اما در تیمارهای A، C، D و F اختلاف معنی داری با دیگر تیمارها دیده نشد ($P>0.05$).



(نمودار ۴-۳) درصد ضریب چاقی ($\text{min} \pm \text{S.D.}$) تیمارهای آزمایشی در پایان هفته هشتم (حروف مشابه بر روی هر یک از ستون‌ها بیانگر عدم اختلاف معنی دار بین تیمارها می باشد)

۴-۴- نسبت بازده پروتئین

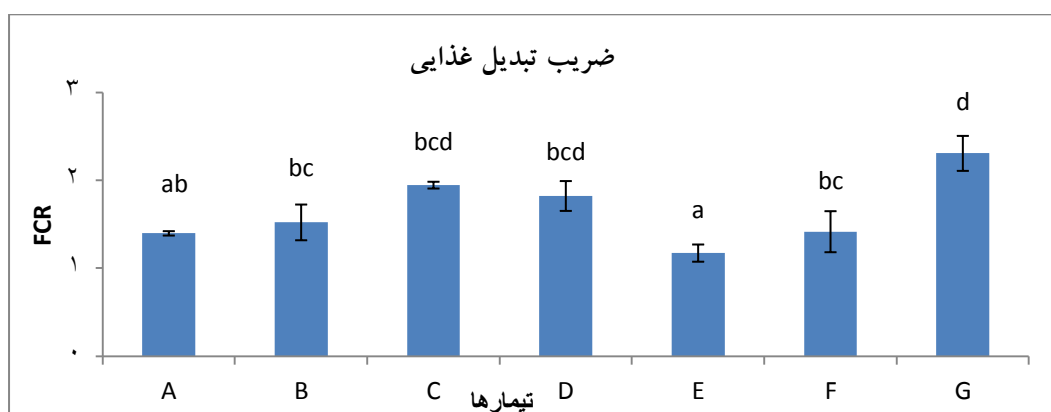
در پایان این بررسی اختلاف معنی داری در نسبت بازده پروتئین بین تیمارها دیده شد، به این صورت که نسبت بازده پروتئین در تیمار E با بالاترین میزان، اختلاف معنی داری با تیمار شاهد و تیمار A داشت ($P<0.05$) و بعد از آن نیز تیمارهای تلفیقی F و تیمار D قرار داشتند. لازم به ذکر است کمترین میزان نسبت بازده پروتئین نیز در تیمار شاهد بدست آمد. به طور کل تیمار تلفیقی E با ۱,۴۱ گرم، بالاترین میزان بازده پروتئین را داشت و تیمار شاهد با ۱,۰۸ گرم کمترین میزان را نشان داد اما اختلاف معنی داری بین تیمار شاهد و دیگر تیمارها به جز تیمار E دیده نشد (نمودار ۴-۴).



(نمودار ۴-۵) نسبت بازده پروتئین (min±S.D) تیمارهای آزمایشی در پایان هفته هشتم (حروف مشابه بر روی هر یک از ستون‌ها بیانگر عدم اختلاف معنی‌دار بین تیمارها می‌باشد)

۴-۵- ضریب تبدیل غذایی

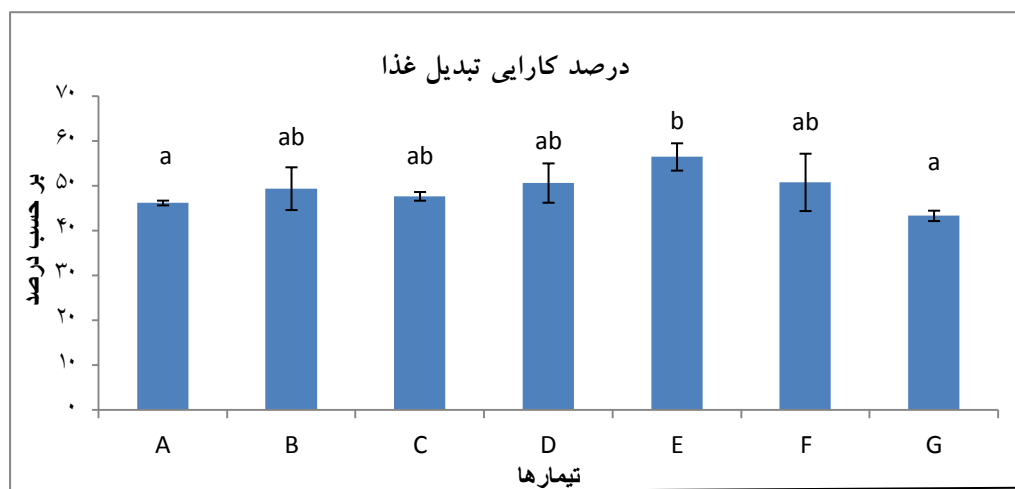
بررسی ضریب تبدیل غذایی در پایان دوره آزمایش اختلاف معنی‌داری بین تیمارها نشان داد. به این صورت که تیمار E و تیمار F کمترین میزان ضریب تبدیل غذایی را داشتند (نمودار ۴-۵). تیمار E با ۱,۱۷ و تیمار F با ۱,۳۹ تفاوت معنی‌داری با تیمار شاهد داشتند ($P < 0.05$). تیمار شاهد با ۲,۳۰ بالاترین ضریب تبدیل غذایی را داشت که به طور معنی‌داری بالاتر از تیمارهای دیگر به جز تیمار C و D بود. لازم به ذکر است اختلاف معنی‌داری بین تیمارهای A، B، C، D و F به دست نیامد ($P > 0.05$).



(نمودار ۵-۵) ضریب تبدیل غذایی (min±S.D) در پایان تحقیق (حروف مشابه بر روی هر یک از ستون‌ها بیانگر عدم اختلاف معنی‌دار بین تیمارها می‌باشد)

۴-۶- درصد کارایی تبدیل غذا

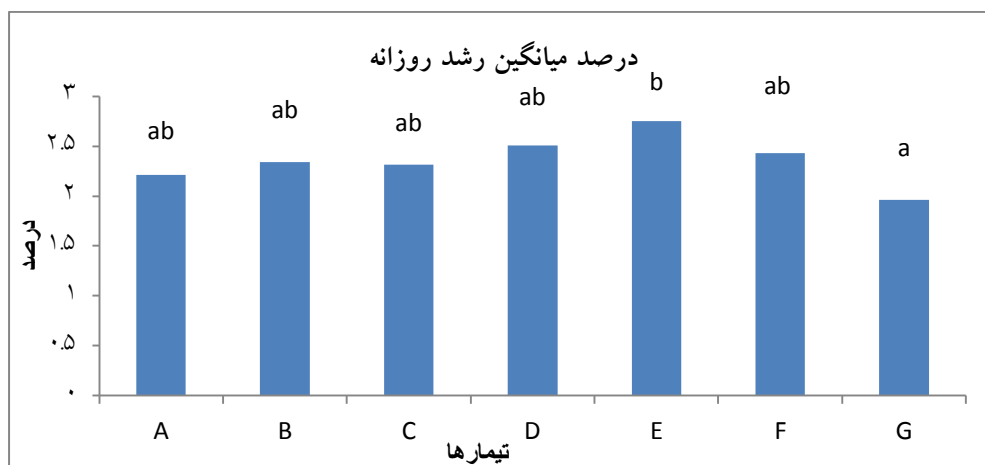
بررسی درصد کارایی غذا در هفت تیمار آزمایشی اختلاف معنی داری بین تیمارها نشان داد. به این صورت که تیمار E با ۵۶,۴۸ درصد بالاترین و تیمار شاهد با ۴۳,۳۴ درصد کمترین درصد کارایی تبدیل غذا را داشتند (نمودار ۴-۶). لازم به ذکر است تیمار E اختلاف معنی داری با تیمار A و تیمار شاهد داشت ($P < 0.05$) اما تفاوت معنی داری بین دیگر تیمارها دیده نشد ($P > 0.05$).



(نمودار ۴-۶) درصد کارایی تبدیل غذا ($\text{min} \pm \text{S.D}$) تیمارهای آزمایشی در پایان هفته هشتم
(حروف مشابه بر روی هر یک از ستون‌ها بیانگر عدم اختلاف معنی دار بین تیمارها می‌باشد)

۴-۷- درصد میانگین رشد روزانه ADG

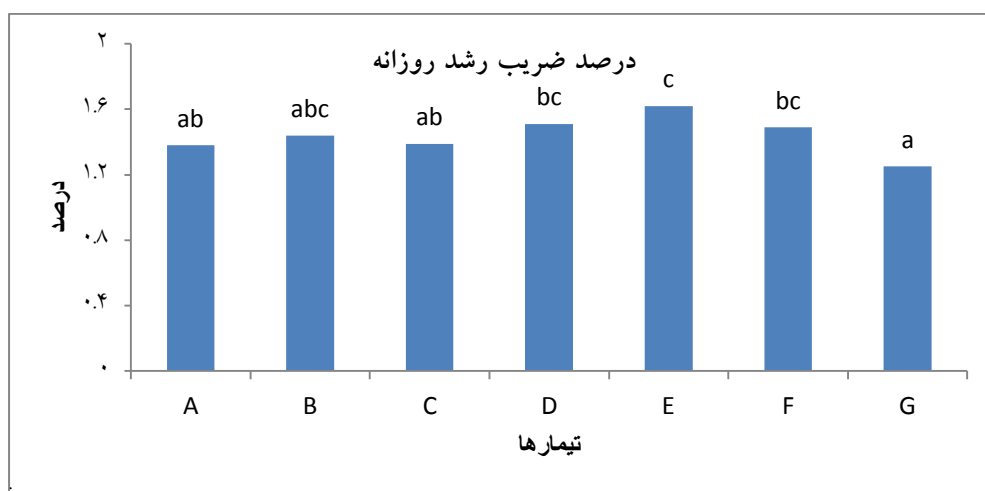
اختلاف معنی داری در روند رشد روزانه در پایان دوره تحقیق بین تیمار تلفیقی E و تیمار شاهد دیده شد ($P < 0.05$). به این صورت که ماهیان تیمار E با ۲,۷۵٪ بالاترین و تیمار شاهد با ۱,۹۵٪ کمترین درصد میانگین رشد روزانه را داشتند (نمودار ۴-۷) اما اختلاف معنی داری بین تیمارهای دیگر دیده نشد ($P > 0.05$).



(شکل ۴-۷) درصد میانگین رشد روزانه ($\min \pm S.D$) تیمارهای آزمایشی در پایان هفته هشتم (حروف مشابه بر روی هر یک از ستون‌ها بیانگر عدم اختلاف معنی‌دار بین تیمارها می‌باشد)

۴-۸- درصد ضریب رشد روزانه DGR

در پایان بررسی درصد ضریب رشد روزانه ماهیان محاسبه گردید. در نتیجه تیمار تلفیقی E و F و تیمار D تفاوت معنی‌داری با تیمار شاهد نشان دادند ($P < 0.05$). به این صورت که ماهیان تیمار E و تیمار D با ۱,۶۲٪ و ۱,۵۱٪ بالاترین و تیمار شاهد با ۱,۲۵٪ کمترین درصد ضریب رشد روزانه را داشتند (نمودار ۴-۸). به طور کلی اختلاف معنی‌داری در درصد ضریب رشد روزانه بین تیمارهای E، F، و D با تیمار شاهد وجود داشت اما در تیمارهای دیگر اختلاف معنی‌داری با این تیمارها و حتی تیمار شاهد دیده نشد، هرچند تمامی تیمارهای حاوی ویتامین نسبت به تیمار شاهد از درصد ضریب رشد روزانه بالاتری برخوردار بودند.



(نمودار ۴-۸) درصد ضریب رشد روزانه ($\min \pm S.D$) تیمارهای آزمایشی در پایان هفته هشتم (حروف مشابه بر روی هر یک از ستون‌ها بیانگر عدم اختلاف معنی‌دار بین تیمارها می‌باشد)

۹-۴- آنالیز فاکتورهای شیمیایی آب

در طول زمان تحقیق، فاکتورهای شیمیایی آب شامل PH، آمونیاک، نیترات، نیتريت، اکسیژن به صورت روزانه اندازه گیری می شد لازم به ذکر است از آب ورودی استخرها نیز نمونه برداری به صورت همزمان با تیمارهای آزمایشی صورت پذیرفت و در پایان دوره اختلاف معنی داری بین هیچ کدام از این فاکتورها در طول مدت تحقیق بین تیمارها دیده نشد ($P>0.05$). میزان هر کدام از این فاکتورها در محدوده تعیین شده و مجاز بود (جدول ۴-۳). همان طور که می دانیم محدوده مجاز PH برای قزل آلاي رنگين کمان ۶,۵-۸,۵، آمونیاک کمتر از ۰,۰۲ میلیگرم در لیتر، نیترات کمتر از ۳ میلیگرم در لیتر و نیتريت کمتر از ۰,۲ میلیگرم در لیتر می باشد که در طول مدت این بررسی هرگز میزان فاکتورهای شیمیایی از محدوده مجاز تجاوز نکرد. میانگین میزان فاکتورهای مورد نظر در مدت زمان ۶۰ روز بررسی در جدول زیر آمده است.

(جدول ۴-۳) آنالیز شیمیایی آب استخرها و آب ورودی

(حروف مشابه بر روی هر یک از ستون‌ها بیانگر عدم اختلاف معنی دار بین تیمارها می باشد)

ردیف	تیمار	PH ۶,۵-۸,۵	آمونیاک میلیگرم در لیتر	نیترات میلیگرم در لیتر	نیتريت میلیگرم در لیتر
۱	A	۸,۴۳ a	صفر	۰,۹۲ a	۰,۰۳a
۲	B	۸,۴۳ a	۰,۰۰۳ a	۰,۹۳ a	۰,۰۴ a
۳	C	۸,۴ a	۰,۰۰۳ a	۰,۸۴ a	۰,۰۵ a
۴	D	۸,۴۳ a	۰,۰۰۳ a	۰,۹۲ a	۰,۰۴ a
۵	E	۸,۴۶ a	صفر	۰,۹۴ a	۰,۰۵ a
۶	F	۸,۴۶ a	۰,۰۰۳ a	۰,۹۵ a	۰,۰۵ a
۷	G	۸,۴۶ a	۰,۰۰۶ a	۰,۰۹۹ a	۰,۰۵ a
۸	آب ورودی	۸,۲۶ a	صفر	۰,۴۶ a	۰,۰۱۶ a

۴-۱۰- آنالیز لاشه

۴-۱۰-۱- درصد رطوبت لاشه

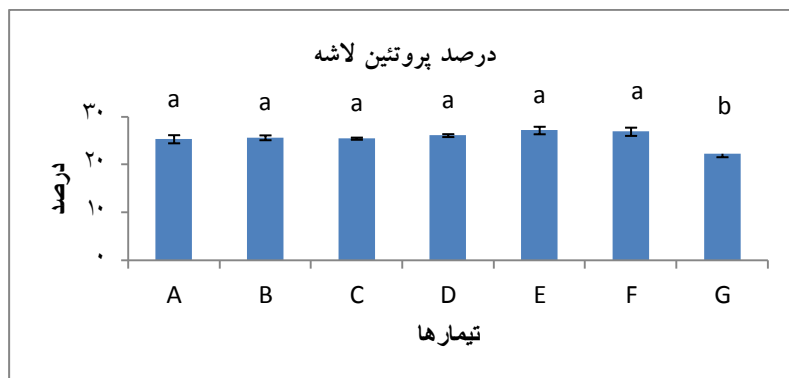
در پایان هفته هشتم، برای تعیین ترکیبات لاشه تعداد ۶ قطعه ماهی از هر تکرار به صورت تصادفی انتخاب و درون یخ به آزمایشگاه منتقل و آنالیز لاشه انجام شد. اندازه گیری میزان رطوبت لاشه ماهیان تیمارهای آزمایشی تفاوت معنی داری را نشان داد ($P < 0.05$). به این صورت که تیمار شاهد با ۶۹/۷٪ دارای بالاترین میزان رطوبت بود و تیمارهای E و F با داشتن به ترتیب ۶۴/۴۶٪ و ۶۴/۶۶٪ کمترین میزان رطوبت را داشتند (نمودار ۴-۹). لازم به ذکر است اختلاف معنی داری در میزان رطوبت لاشه ماهیان تیمارهایی که از ویتامین استفاده کرده بودند دیده نشد ($P > 0.05$).



(نمودار ۴-۹) درصد میزان رطوبت لاشه ($\text{min} \pm \text{S.D}$) در پایان هفته هشتم
(حروف مشابه بر روی هر یک از ستون‌ها بیانگر عدم اختلاف معنی دار بین تیمارها می‌باشد)

۴-۱۰-۲- درصد پروتئین لاشه

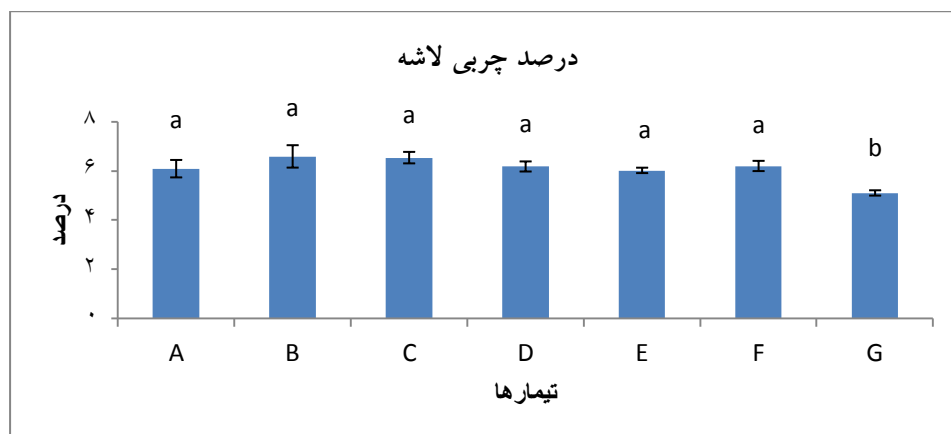
بررسی میزان پروتئین لاشه ماهیان تیمارهای مختلف در انتهای هفته هشتم، اختلاف معنی داری را نشان داد ($P < 0.05$). به این صورت که تیمار E و F با ۲۷/۱۴٪ و ۲۶/۸۸٪ بالاترین میزان و تیمار شاهد با ۲۲/۲۹٪ درصد کمترین میزان پروتئین در لاشه را داشتند (نمودار ۴-۱۰). لازم به ذکر است اختلاف معنی داری در میزان پروتئین لاشه بین تیمارهای حاوی ویتامین دیده نشد ($P > 0.05$).



(نمودار ۴-۱۰) درصد میزان پروتئین لاشه ($\text{min} \pm \text{S.D}$) در ۷ تیمار
(حروف مشابه بر روی هر یک از ستون‌ها بیانگر عدم اختلاف معنی‌دار بین تیمارها می‌باشد)

۴-۱۰-۳- درصد چربی لاشه

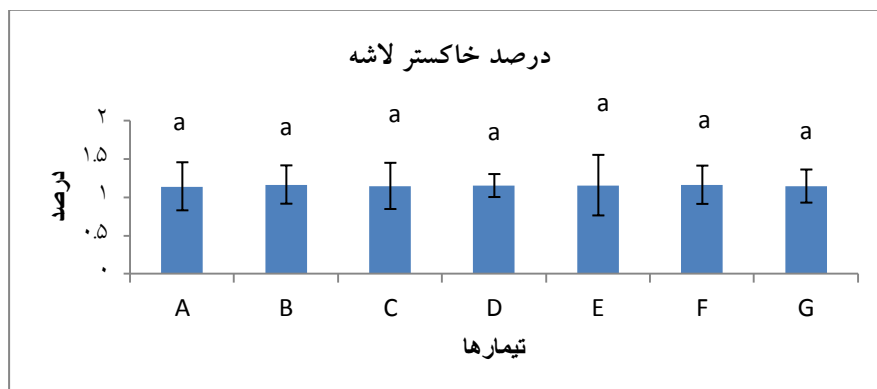
بررسی میزان چربی لاشه ماهیان تیمارهای آزمایشی نیز اختلاف معنی‌داری را نشان داد (نمودار ۴-۱۱). البته در آنالیز چربی نیز همچون اندازه‌گیری پروتئین و رطوبت تفاوت محسوسی بین تیمارهای A تا E (تیمارهای حاوی ویتامین) وجود نداشت اما همه تیمارهای حاوی ویتامین با تیمار شاهد اختلاف معنی‌داری را نشان دادند ($P < 0.05$). لازم به ذکر است ماهیان تیمار C با ۶/۵۳٪ دارای بالاترین درصد چربی و تیمار شاهد با ۵/۱ درصد کمترین میزان چربی لاشه را داشتند.



(نمودار ۴-۱۱) درصد میزان چربی لاشه ($\text{min} \pm \text{S.D}$) در پایان هفته هشتم
(حروف مشابه بر روی هر یک از ستون‌ها بیانگر عدم اختلاف معنی‌دار بین تیمارها می‌باشد)

۴-۱۰-۴- درصد خاکستر لاشه

بررسی میزان خاکستر در لاشه ماهیان تیمارهای آزمایشی اختلاف معنی داری را نشان نداد ($P>0.05$). همانطور که در نمودار (۴-۱۲) ترسیم شده است این میزان در تمامی تیمارها حدوداً برابر بوده و این موضوع بیانگر این است که میزان ویتامین ها تاثیر خاصی بر میزان خاکستر لاشه ماهی ندارد.



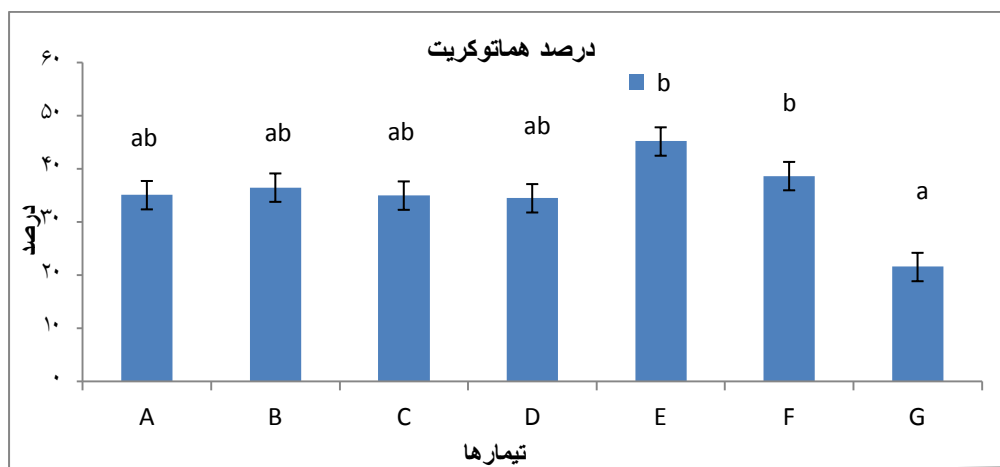
(نمودار ۴-۱۲) درصد میزان خاکستر لاشه ($\text{min} \pm \text{S.D}$) در ۷ تیمار

(حروف مشابه بر روی هر یک از ستون‌ها بیانگر عدم اختلاف معنی دار بین تیمارها می‌باشد)

۴-۱۱- نتایج بررسی شاخص های خونی

۴-۱۱-۱- هماتوکریت

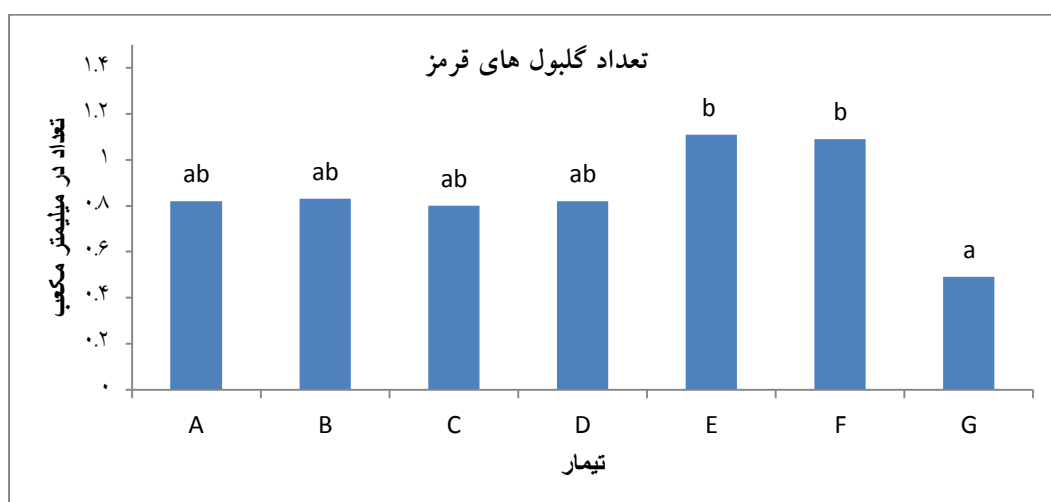
بررسی فاکتورهای خونی ماهیان در پایان هفته هشتم انجام پذیرفت. بررسی میزان هماتوکریت خون ماهیان تحت بررسی در ۷ تیمار آزمایشی نشان داد، ماهیان تیمارهای تلفیقی E و F به ترتیب با $45/16\%$ و $38/66\%$ بالاترین و تیمار شاهد با $21/58\%$ کمترین درصد هماتوکریت را داشتند (نمودار ۴-۱۳) و اختلاف معنی داری بین این تیمارها وجود داشت ($P<0.05$). اما اختلاف معنی داری بین تیمارهایی که تنها از یک ویتامین استفاده نمودند با تیمار شاهد و تیمارهای تلفیقی به دست نیامد.



(نمودار ۴-۱۳) درصد میزان هماتوکریت خون ($\text{min} \pm \text{S.D}$) در پایان هفته هشتم (حروف مشابه بر روی هر یک از ستون‌ها بیانگر عدم اختلاف معنی‌دار بین تیمارها می‌باشد)

۴-۱۱-۲- گلبول‌های قرمز یا Erythrocytes

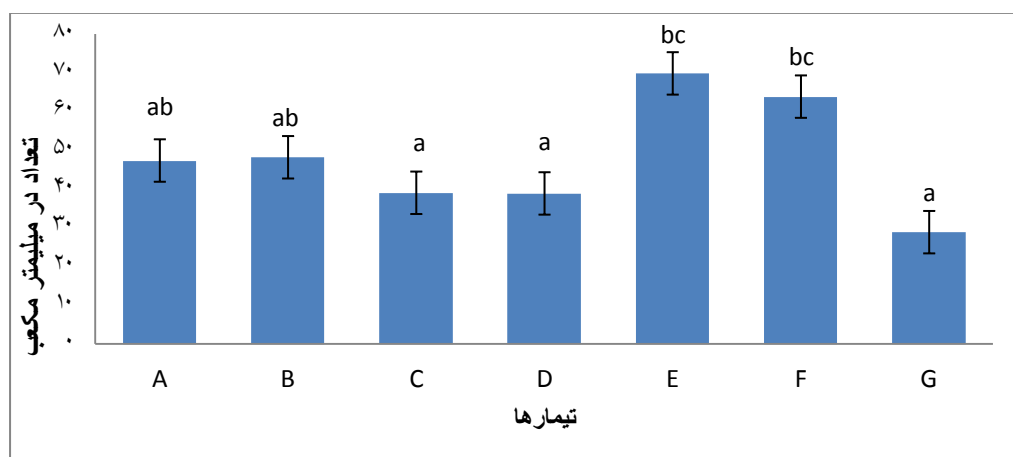
مقایسه تعداد گلبول‌های قرمز در میان هفت تیمار آزمایشی نشان داد ماهیان تیمار E با $1.1 \times 10^6/\text{mm}^3$ و تیمار F با $1.09 \times 10^6/\text{mm}^3$ بالاترین و تیمار شاهد با $0.49 \times 10^6/\text{mm}^3$ کمترین تعداد گلبول‌های قرمز را داشتند و اختلاف معنی‌داری بین این تیمارها وجود داشت ($P < 0.05$). ولی با وجود بالاتر بودن محسوس تعداد گلبول‌های قرمز در تیمارهای دیگر نسبت به تیمار شاهد اختلاف معنی‌داری بین این تیمارها با تیمار شاهد و تلفیقی به دست نیامد (نمودار ۴-۱۴).



(نمودار ۴-۱۴) تعداد گلبول‌های قرمز خون ($\text{min} \pm \text{S.D}$) (تعداد $\times 10^6$ در میلیون مکعب) پایان هفته هشتم (حروف مشابه بر روی هر یک از ستون‌ها بیانگر عدم اختلاف معنی‌دار بین تیمارها می‌باشد)

۴-۱۱-۳- گلبول های سفید یا Leucocytes

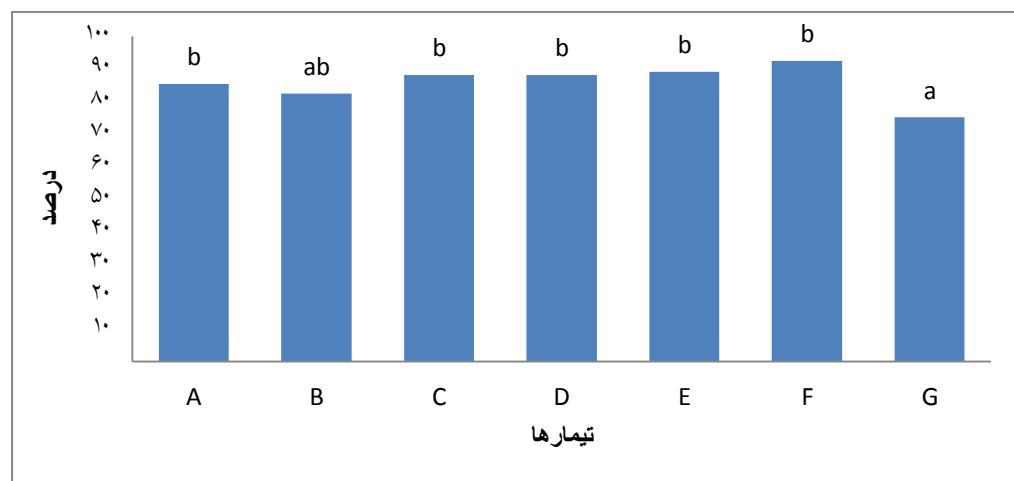
شمارش تعداد گلبول های سفید در ۷ تیمار آزمایشی نشان داد ماهیان تیمار تلفیقی E با داشتن $69/83 \times 10^4/mm^3$ دارای بالاترین تعداد گلبول های سفید و تیمار شاهد با $28/8 \times 10^4/mm^3$ دارای کمترین تعداد گلبول های سفید هستند (نمودار ۴-۱۵). لازم به ذکر است تعداد گلبول های سفید خون در ماهیان تیمارهایی که از ویتامین E به تنهایی استفاده کرده بودند و تیمار شاهد تفاوت معنی داری با تیمارهای تلفیقی داشت اما تیمارهای که از ویتامین C به تنهایی استفاده نمودند، تفاوت معنی داری با دیگر تیمارها نداشتند ($P>0.05$).



(نمودار ۴-۱۵) تعداد گلبول های سفید خون ($\min \pm S.D$) (تعداد $\times 10^4$ در میلیتر مکعب) در پایان هفته هشتم (حروف مشابه بر روی هر یک از ستون ها بیانگر عدم اختلاف معنی دار بین تیمارها می باشد)

۴-۱۱-۴- درصد لنفوسیت ها

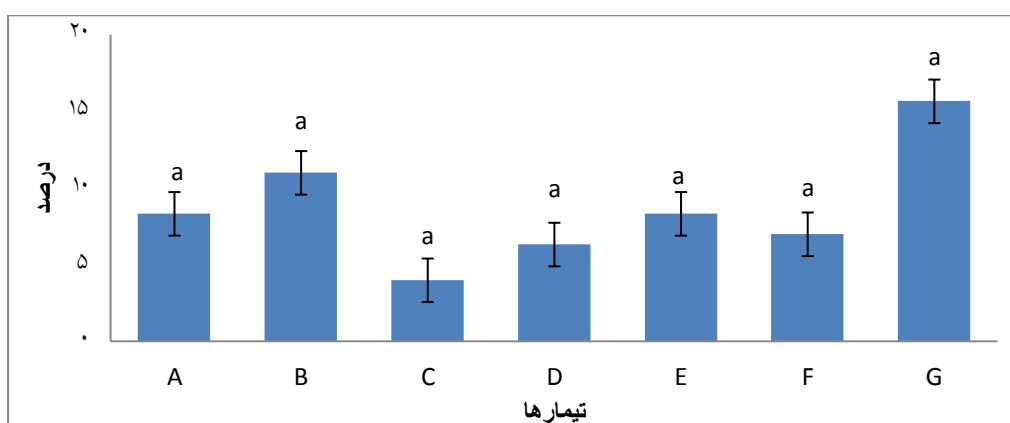
بررسی میزان لنفوسیت های خون ماهیان در پایان هفته هشتم، اختلاف معنی داری را بین تیمارها نشان داد ($P<0.05$). به این صورت که تیمار تلفیقی E با $93/33\%$ بالاترین درصد و تیمار شاهد با 75% کمترین درصد لنفوسیت ها را داشتند. دیگر تیمارها به جز تیمار B نیز اختلاف معنی داری با تیمار شاهد داشتند اما اختلاف معنی داری در تعداد لنفوسیت های خون ماهیان تیمارهای حاوی ویتامین دیده نشد (نمودار ۴-۱۶).



(نمودار ۴-۱۶) نمودار درصد لنفوسیت در گلبول‌های سفید خون ($\text{min} \pm \text{S.D.}$) در پایان هفته هشتم (حروف مشابه بر روی هر یک از ستون‌ها بیانگر عدم اختلاف معنی‌دار بین تیمارها می‌باشد)

۴-۱۱-۵- درصد منوسیت‌ها

در بررسی تعداد منوسیت‌های خون ماهیان، اختلاف معنی‌داری بین هفت تیمار آزمایشی دیده نشد ($P > 0.05$). اما ماهیان تیمار C با ۴٪ کمترین و ماهیان تیمار شاهد با ۱۵٫۶٪ بالاترین تعداد منوسیت خون را داشتند (نمودار ۴-۱۷).



(نمودار ۴-۱۷) درصد منوسیت در گلبول‌های سفید خون ($\text{min} \pm \text{S.D.}$) در پایان هفته هشتم (حروف مشابه بر روی هر یک از ستون‌ها بیانگر عدم اختلاف معنی‌دار بین تیمارها می‌باشد)

۴-۱۱-۶- میزان هموگلوبین خون

اندازه گیری میزان هموگلوبین خون ماهیان در پایان تحقیق، تفاوت معنی داری بین تیمارها نشان داد ($P<0.05$) به این صورت که تیمار F با ۹,۴۹ گرم بر صد میلی لیتر بیشترین و تیمار شاهد با ۷,۷۳ گرم بر صد میلی لیتر کمترین میزان را داشتند (جدول ۴-۴). در این بررسی میزان هموگلوبین خون در تمامی تیمارهای حاوی ویتامین بیشتر از تیمار شاهد بود، اما میزان هموگلوبین خون در این تیمارها تفاوت معنی داری با تیمارهای تلفیقی و تیمار شاهد نشان نداد ($P>0.05$).

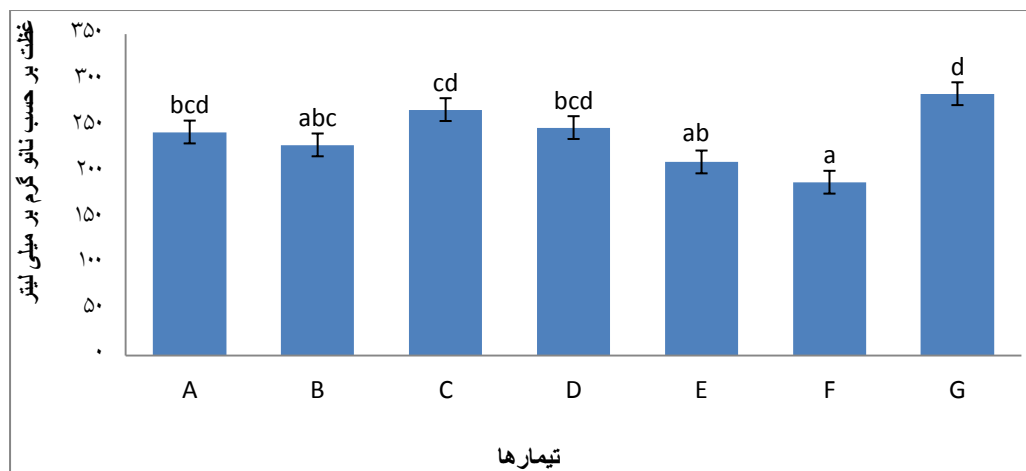
(جدول ۴-۴) میزان هموگلوبین خون در پایان هفته هشتم
(حروف مشابه بیانگر عدم اختلاف معنی دار بین تیمارها می باشد)

تیمار	A	B	C	D	E	F	G
میزان هموگلوبین gr/100ml	۸,۷۵ab	۹,۱۸ ab	۹,۰۶ ab	۸,۸۵ ab	۹,۴۴ b	۹,۴۹ b	۷,۷۳a

۴-۱۲- میزان کورتیزول سرم خون بعد از استرس حرارتی

بررسی میزان کورتیزول خون در ماهیانی که تحت استرس حرارتی ۵ سانتیگراد قرار گرفته بودند تفاوت معنی داری را بین ۷ تیمار آزمایشی نشان داد ($P<0.05$). به این صورت که ماهیانی که از جیره غذایی تلفیقی استفاده کرده بودند کمترین میزان کورتیزول و ماهیان تیمار شاهد دارای بالاترین سطح میزان کورتیزول در خون بودند. لازم به ذکر است، میزان کورتیزول در سرم خون ماهیان تیمار B و تیمارهای تلفیقی تفاوت معنی داری با تیمار شاهد داشت اما تیمارهای A، C و D با وجود اینکه به میزان محسوسی کمتر از تیمار شاهد بودند اما تفاوت معنی داری با تیمار شاهد نداشتند ($P>0.05$). نتیجه این بررسی نشان داد تیمارهایی که از دو ویتامین به صورت تلفیقی استفاده نمودند در برابر استرس قوی تر هستند. به این صورت که ماهیان تیمارهای تلفیقی F با ۱۸۸,۷۴ نانوگرم بر میلی لیتر^{۳۷} و E با ۲۱۰,۸۲ نانوگرم بر میلی لیتر کمترین و تیمار شاهد با ۲۸۵,۱۱ نانوگرم بر میلی لیتر بیشترین میزان کورتیزول در خون را داشتند. همانطور که در نمودار ۴-۱۸ مشخص شده است، اختلاف معنی داری بین غلظت کورتیزول خون در ماهیان تیمار F و تیمار شاهد و تیمارهای C، D و A بدست آمد ($P<0.05$) اما تیمار B نسبت به تیمارهای تلفیقی تفاوت معنی داری نداشت.

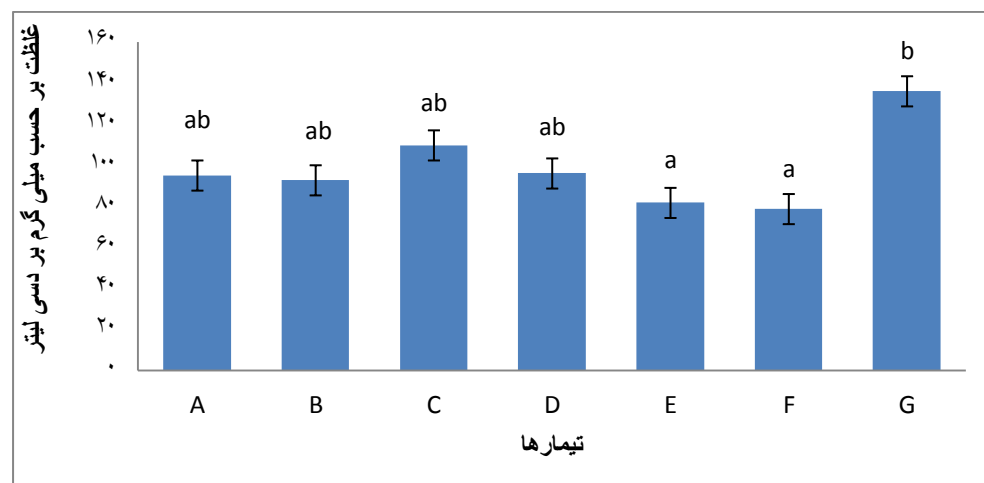
ng/ml^{۳۷}



(نمودار ۴-۱۸) غلظت کورتیزول سرم خون ($\text{min} \pm \text{S.D}$) بعد از شوک حرارتی
(حروف مشابه بر روی هر یک از ستون‌ها بیانگر عدم اختلاف معنی‌دار بین تیمارها می‌باشد)

۴-۱۳- میزان گلوکز در سرم خون

در پایان تحقیق میزان گلوکز سرم خون نیز در ماهیان تیمارها بعد از استرس اندازه‌گیری شد و تفاوت معنی‌داری به دست آمد ($P < 0.05$). در این بررسی ماهیان تیمارهای تلفیقی E و F با داشتن به ترتیب ۷۸/۶۶ و ۸۱/۶۶ میلی‌گرم بر دسی‌لیتر کمترین و تیمار شاهد با ۱۳۶ میلی‌گرم بر دسی‌لیتر بالاترین میزان گلوکز را داشتند (نمودار ۴-۱۹). لازم به ذکر است با وجود اینکه میزان گلوکز در سرم خون تیمارهای دیگر به خصوص تیمارهای حاوی ویتامین C به طور محسوسی کمتر از تیمار شاهد بود اما تفاوت معنی‌داری بین آنها وجود نداشت ($P > 0.05$).



(نمودار ۴-۱۹) غلظت گلوکز سرم خون بر حسب میلیگرم بر دسی لیتر ($\text{min} \pm \text{S.D}$) بعد از شوک حرارتی
(حروف مشابه بر روی هر یک از ستون‌ها بیانگر عدم اختلاف معنی دار بین تیمارها می‌باشد)

فصل پنجم

نتیجه‌گیری و پیشنهادات

۵-۱- بحث

یکی از اهداف اولیه آبی پروری تولید گونه های مختلف آبی برای تولید غذا و همچنین بازسازی ذخایر است. هدف اصلی مطالعات تغذیه ای با تبدیل غذای ماهی به گوشت در زمان کوتاه و به همراه سود و مزایای اقتصادی دنبال می شود. در آبی پروری، شرایط پرورش همچون: تراکم گله، دما، کیفیت آب و وضعیت تغذیه به طور واضح بر روی رشد ماهی می تواند موثر باشد (Bridges & Kling, 2000). از اینرو با توجه به اینکه سهم خوراک در رشد و بازماندگی آبیان پرورشی و هزینه های تولید به ویژه در سیستم های متراکم بسیار قابل توجه بوده و حائز اهمیت است، بنحوی که بیش از ۵۰٪ هزینه های تولید را در بر می گیرد. فرمولاسیون جیره غذایی با توجه به احتیاجات غذایی گونه ماهی، با استفاده از مواد اولیه با کیفیت مطلوب و غنی تاثیر زیادی بر بهبود روند تولید دارد (آذری تاکامی، ۸۲).

نقش سودمند ویتامین های C و E در شاخص های رشد توسط محققین زیادی بررسی و به ثبت رسیده است (Wahli et al., 2003 ; Wang et al., 2003 ; Belo et al., 2005). در سیستم های متراکم پرورش ماهی اضافه نمودن ویتامین ها به جیره غذایی امری ضروری است، زیرا ویتامین ها به عنوان ترکیبات کوآنزیم باعث تسریع فعالیت های زیستی می گردند (بشارت و نظافتی، ۱۳۷۱). از آنجاییکه ویتامین های افزوده شده به غذای آماده و پلت آبیان طی فرایند تولید و یا نگهداری در انبار از بین می روند بنابراین توصیه می شود میزان بیشتری از حد نیاز به جیره غذایی اضافه شوند و یا اینکه مدت زمان و شرایط نگهداری غذا مناسب باشد (Heen et al., 1993).

به همین علت در این بررسی سعی شده است تاثیر اضافه نمودن ویتامین E و C و اثرات استفاده توأمان این دو ویتامین، بر رشد ماهی قزل آلا رنگین کمان بررسی گردد. در بررسی حاضر، درصد افزایش وزن در ماهیان قزل آلا در تیمار E تلفیقی (۵۰ میلی گرم ویتامین C و ۵۰ میلی گرم ویتامین E در کیلوگرم غذا) بیشتر از سایر تیمارها بدست آمد و این اختلاف معنی دار بود ($P < 0.05$). در تیمار D نیز درصد افزایش وزن بالا بود. این نتایج بیانگر این مطلب است که سطوح ویتامینی استفاده شده در جیره ها روی درصد وزن کسب شده تاثیرگذار بوده است. همچنین سطوح بالای تلفیقی ویتامین C و E در تیمار ۱۰۰ میلی گرم ویتامین E و C در کیلوگرم غذا، اختلاف معنی دار آماری با تیمارهایی که دارای ویتامین E یا C به تنهایی

بودند، نداشته است. به عبارت دیگر استفاده از ویتامین C و E در این مطالعه تاثیر متقابلی روی هم نداشته اند، ولی نتایج به دست آمده بیانگر این مطلب است که ویتامین E موثرتر بوده است.

Hamre و همکاران (۱۹۹۷) نسبت بین ویتامین C و E در رشد ماهیان سالمون جوان اقیانوس اطلس را بررسی کردند و به این نتیجه رسیدند که نیاز به ویتامین C احتمالاً بستگی به سطوح ویتامین E در جیره غذایی دارد.

تاتینا و همکاران (۱۳۹۱) به این نتیجه رسیدند که واکنش متقابل مثبتی بین سطوح بالای ویتامین E جیره و سطوح پایین ویتامین C روی وزن کسب شده ماهیان استرلیاد پرورشی وجود دارد.

فلاحکار و همکاران (۱۳۸۵) در مطالعه ای که به منظور پرورش فیل ماهیان جوان با وزن متوسط $381/1 \pm 0/5$ گرم و با مقادیر صفر، ۱۰۰، ۲۰۰، ۴۰۰، ۸۰۰ و ۱۶۰۰ میلی گرم در کیلوگرم از ویتامین C طی ۱۶ هفته انجام دادند، اختلافات معنی داری را بین وزن کسب شده در تیمارهای مختلف مشاهده کردند.

Papp و همکاران (۱۹۹۵) با بررسی اثر سطوح مختلف ویتامین C در تاس ماهی هیبرید با وزن متوسط $11/9 \pm 2/1$ گرم در شروع آزمایش، پس از ۸ هفته پرورش و در دمای ۲۲-۲۳ درجه سانتی گراد و رسیدن ماهیان به ۵ برابر وزن ابتدائی، هیچ اختلاف معنی داری را مشاهده نکردند، ولی اثر مثبت ناچیزی به دنبال اضافه نمودن ویتامین C در میزان رشد ماهیان در بررسی آنها مشهود بود.

نتایج حاصل از بررسی فوق نشان داد که سرعت رشد ویژه و درصد افزایش وزن بدن طی ۶۰ روز پرورش تحت تاثیر سطوح مختلف ویتامین C و E جیره بوده است. در این بررسی سرعت رشد و درصد افزایش وزن در تیمار E با گروه شاهد تفاوت معنی دار آماری داشته است ($P < 0.05$)، درحالیکه سایر تیمارها با گروه کنترل اختلاف معنی دار آماری نداشتند ($P > 0.05$). نتایج بیانگر این موضوع بودند که سطوح بالای ترکیبی ویتامین های مورد استفاده (۱۰۰ میلی گرم ویتامین C و E در کیلوگرم غذا) تفاوت فاحشی در پارامترهای رشد ماهی قزل آلا با تیمارهایی که به صورت تکی از ویتامین های فوق استفاده شده بود، نشان ندادند، اما نسبت ۵۰ به ۵۰ ویتامین E و C نتیجه بهتری برای دستیابی به رشد بیشتر نشان داد. بنابراین می توان اذعان داشت که نسبت ۵۰ میلیگرم ویتامین های E و C از ۱۰۰ میلیگرم در تغذیه قزل آلا رنگین کمان مناسب تر می باشد.

فلاحکار (۱۳۸۶) در بررسی ساخت اسید اسکوربیک در تاس ماهی سیبری، تاس ماهی دریاچه ای و فیل ماهی به این نتیجه رسید که استفاده از مقادیر مختلف ویتامین C تاثیر معنی داری در نرخ کارائی پروتئین نداشته است. در تحقیق حاضر تیمار ترکیبی E و F از بیشترین نرخ کارائی پروتئین برخوردار بود که تفاوت معنی دار آماری با سایر تیمارها داشت ($P < 0.05$).

Gaatin و Sealey در سال ۲۰۰۲، با بررسی تاثیر واکنش بین ویتامین های C و E جیره غذایی بر رشد ماهیان جوان باس راه راه با وزن اولیه ۱۲ گرم و بعد از ۱۰ هفته پرورش یافتند که کارایی غذا بطور معنی داری تحت تاثیر ویتامین جیره بوده است. اختلاف معنی داری بین سطوح ویتامین C و E نیز مشاهده شد. سطوح مورد استفاده از ویتامین C کارایی تغذیه را افزایش داده بود. در حالیکه در مطالعه فوق درصد کارایی تبدیل غذا در تیمارهای B، C، D، F با تیمار E و شاهد تفاوت معنی دار آماری نداشتند ($P>0.05$)، ولی تیمار E و A تفاوت معنی دار آماری با تیمار شاهد داشتند ($P<0.05$).

Lenient و همکاران در سال ۲۰۰۸، با بررسی تاثیر سطوح مختلف ویتامین E جیره (۰، ۲۵، ۵۰، ۷۵، ۱۰۰، ۱۲۵ و ۱۵۰ میلی گرم در کیلوگرم) بر رشد بچه ماهیان انگشت قد (*Heterobranchus longifilis*) دریافتند که شاخص ضریب رشد ویژه در ماهیانی که با جیره حاوی ۵۰ میلی گرم در کیلوگرم ویتامین E تغذیه شدند، نسبت به جیره فاقد مکمل و سایر تیمارها بیشتر بود. البته این اختلاف نسبت به گروه شاهد و گروه های دیگر تغذیه شده با سطوح دیگر ویتامین E معنی دار نبود.

این بررسی همچنین با بررسی Tocher و همکاران در سال ۲۰۰۳ که اثر اضافه نمودن ویتامین E را در سرعت رشد ماهی سیم دریایی موثر ارزیابی کرده بودند همخوانی دارد.

یکی از عوامل اقتصادی بودن پرورش آبزیان تعیین شاخص های رشد آنهاست. ضریب تبدیل غذایی یکی از مهم ترین شاخص های رشد است که هرچه مقدار آن پایین تر باشد بهتر بوده و کارایی پرورش و تولید را افزایش می دهد. در مطالعه فوق تیمار E شامل ۵۰ میلی گرم ویتامین C و E در کیلوگرم غذا با هم توانست ضریب تبدیل غذا را به ۱/۱۷ کاهش دهد. در حالیکه تیمار ۱۰۰ میلی گرم ویتامین C و E در کیلوگرم غذا آن را به ۱/۹۸ کاهش داد (نسبت به تیمار شاهد ۲/۳۰). می توان نتیجه گرفت که حتی سطوح پایین ویتامین های فوق می توانند بر میزان رشد ماهی قزل آلا موثر باشند.

به طور کل می توان اذعان نمود نتایج این بررسی اثرات مثبت ویتامین های E و C را در رشد ماهی قزل آلا تایید می نماید. از آنجاییکه تیمار تلفیقی E بالاترین میزان شاخص های رشد را نشان داد، می توان علت این افزایش رشد را در نتیجه اثر همپوشانی دو ویتامین در ارتقا این فاکتورها دانست. تاثیر ویتامین C، به عنوان یک کوانزیم ضروری، در اکسیداسیون تیروزین و فنیل آلانین (Brander & Pugh, 1977) و همچنین اثر این ویتامین در سنتز کلاژن (Terova et al., 1998; Smedsrod et al., 1993) به همراه اثر ویتامین E به عنوان کوفاکتور بر آنزیم های چرخه کربس را میتوان دلیل افزایش فاکتورهای رشد در جیره های تلفیقی دانست.

لازم به ذکر است در بررسی فوق درصد بقای تیمارهای مختلف نیز در انتهای دوره محاسبه گردید. تعداد تلفات به صورت روزانه گزارش می شد اما در انتهای دوره همه تیمارها با داشتن درصد بقای ۹۸-۹۹

درصد اختلاف معنی داری را نشان ندادند. که این مسئله می تواند به علت شرایط پرورشی بسیار مساعد مزرعه مرزن قزل باشد.

در طول زمان تحقیق، فاکتورهای شیمیایی آب شامل PH، آمونیاک، نیترات، نیتريت، اکسیژن به صورت روزانه اندازه گیری می شد لازم به ذکر است از آب ورودی استخرها نیز نمونه برداری به صورت همزمان با تیمارهای آزمایشی صورت پذیرفت و در پایان دوره اختلاف معنی داری بین هیچ کدام از این فاکتورها در طول مدت تحقیق بین تیمارها دیده نشد ($P>0.05$). میزان هر کدام از این فاکتورها در محدوده تعیین شده و مجاز بود. همان طور که می دانیم محدوده مجاز PH برای قزل آلاي رنگين کمان ۸٫۵-۶٫۵، آمونیاک کمتر از ۰٫۲ میلیگرم در لیتر، نیترات کمتر از ۳ میلیگرم در لیتر و نیتريت کمتر از ۰٫۲ میلیگرم در لیتر می باشد که در طول مدت این بررسی هرگز میزان فاکتورهای شیمیایی از محدوده مجاز تجاوز نکرد. این عدم تاثیر ویتامین ها در فاکتورهای شیمیایی و کیفیت آب استخر تایید می کند.

اثرات تلفیقی ویتامین E و C بر سیستم ایمنی ماهیان از دیر باز موضوع بحث برانگیزی بوده و تحقیق و بررسی در این زمینه تا کنون در مورد سه گونه از ماهیان (گره ماهی کانالی، ماهی آزاد اقیانوس اطلس و قزل آلاي رنگين کمان) انجام پذیرفته است. به عنوان مثال، در حالیکه برخی بررسی ها حاکی از کاهش میزان ماکروفاژهای فاگوسیتوز کننده در اثر عدم استفاده از ویتامین C بوده اند (Li and Lovell, 1985; Blazer, 1992) برخی دیگر معتقداند حضور این ویتامین در مهاجرت، فاگوسیتوز و انفجار تنفسی و فعالیت ضد باکتریایی بی اثر است (Hardie et al., 1991; Thompson et al., 1993) به همین صورت استفاده از ویتامین C در سیستم های طبیعی تغییری در انفجار تنفسی ماکروفاژها نداشته است (Hardie et al., 1993). همان طور که می دانید مطالعات خون شناسی ابزار ارزشمندی در تعیین شرایط فیزیولوژیکی در ماهیان می باشند، بنابراین پارامترهای خونی به مقدار زیادی به عنوان شاخص های شرایط فیزیولوژیکی در ماهی نسبت به تغییراتی با منشاء داخلی یا خارجی مورد استفاده و ارزیابی قرار می گیرد (Cataldi et al., 2001; Belanger et al., 1998).

تعامل ویتامین E و C بر شاخص های زیستی ماهیان در شرایط آزمایشگاهی (غیر طبیعی) تا حدودی بررسی شده است (Hamer et al., 1997) گزارش های معدودی نیز در این زمینه در شرایط طبیعی وجود دارد که همگی ارتقاء سیستم ایمنی در نتیجه استفاده توأم آنها را تایید می کنند (Mulero et al., 1999). تحقیق حاضر به منظور بررسی همکاری سینرژیک بین این دو ماده مغذی در زمینه ارتقاء سیستم ایمنی و رشد ماهی قزل آلاي رنگين کمان انجام پذیرفته است.

ماهی ها در طول دوره پرورش به طور متناوب در برابر شرایط استرس زا قرار می گیرند که این امر باعث به وجود آمدن یکسری تغییرات فیزیولوژیکی در آنها می شود که به نام استرس شناخته می شود (Wedemeyer, 1996; Barto, 2002) اولین مرحله از عکس العمل ماهی در مواجهه با استرس (مرحله

ابتدایی) مرحله‌ایست که سیستم عصبی-هورمونی وارد عمل شده و با ترشح سریع هورمون‌های استرس شامل کورتیزول و کتکول‌آمین‌ها در سیستم گردش خون ماهی همراه است (Affonso, 2007). استرس یک امر اجتناب ناپذیر در سیستم‌های متراکم پرورش ماهی است که طی جابه‌جایی، صید، رقم‌بندی، دستکاری غیره ایجاد می‌شود و باعث کاهش ایمنی و افزایش احتمال بیماری می‌گردد. عوامل استرس‌زا مجموعه عکس العمل‌های فیزیولوژیکی را در ماهی ایجاد می‌کنند از اینرو این تغییرات فیزیولوژیکی به عنوان نشانگر استرس استفاده می‌شود. در اکثر مطالعاتی که در زمینه استرس انجام شده است سطح هورمون کورتیزول در سرم خون به عنوان مهمترین پارامتر فیزیولوژیکی در تشخیص استرس مورد استفاده قرار می‌گیرد (Wendelaar, 1997). میزان کورتیزول در سرم خون ماهی در حالت معمولی بسیار کم است، اما در ماهیانی که تحت استرس قرار گرفته‌اند این میزان تا ۵ برابر میزان معمول افزایش می‌یابد (Kubulay *et al.*, 2002). با افزایش میزان ویتامین‌های E و C در غذای ماهی، می‌توان اثرات استرس را تا اندازه قابل توجهی کاهش داد (Ortuno *et al.*, 2003). کمبود ویتامین‌ها در جیره غذایی باعث بالا رفتن کورتیزول خون و تغییر در پارامترهای خونی ماهیان می‌شود (Henrique *et al.*, 1998; Montero *et al.*, 2001). به همین علت در این بررسی اثر میزان ویتامین‌های E و C در جیره غذایی بر برخی پارامترهای فیزیولوژیک نشانگر استرس، مورد بررسی قرار گرفته است. بالا رفتن میزان کورتیزول در پلاسمای خون ماهیان یک عامل بازدارنده ایمنی است (Pickering & Pottinger, 1985; Maule *et al.*, 1989; Montero *et al.*, 1999)، که در نتیجه سبب بالا رفتن حساسیت و آسیب‌پذیری ماهی در برابر بیماری و عوامل بیماری‌زا می‌شود (Barton & Lwama, 1991; Harris & Bird, 2000).

تحقیق حال حاضر اثر ویتامین E و C را در افزایش تحمل در برابر استرس حرارتی با اندازه‌گیری هورمون‌های کورتیزول و گلوکز بعد از مجاورت نمونه‌ها با استرس حرارتی بررسی نمود. نتیجه این بررسی نشان داد تیمارهایی که از دو ویتامین به صورت تلفیقی استفاده نمودند در برابر استرس قوی‌تر هستند. به این صورت که ماهیان تیمار تلفیقی F با ۱۸۸,۷۴ نانوگرم بر میلی لیتر^{۳۸} و تیمار E با ۲۱۰,۸۲ نانوگرم بر میلی لیتر کمترین میزان کورتیزول در سرم خون را داشتند که اختلاف معنی‌داری بین این تیمارها و تیمار شاهد و تیمارهای A، C و D بود ($P < 0.05$).

در این بررسی ماهیانی که در تیمارهای C و D قرار گرفته بودند و تنها از ویتامین E همراه با غذای اکستروود تغذیه شده بودند اختلاف معنی‌داری را در میزان کورتیزول خون با گروه شاهد نشان ندادند ($P > 0.05$). ماهیان تیمار D با غلظت کورتیزول ۲۳۸,۲۲ نانوگرم بر میلی لیتر و ماهیان تیمار C با ۲۵۷,۷۹ نانوگرم بر میلی لیتر اختلاف معنی‌داری را با تیمارهای حاوی ویتامین C به تنهایی و تیمار تلفیقی E نداشتند. ولی به

طور کل در این بررسی در عین اینکه اختلاف معنی داری بین غلظت کورتیزول سرم خون، بین تیمارهای حاوی ویتامین E و ویتامین C نبود اما تیمارهای حاوی ویتامین C، کورتیزول خون کمتری داشتند که این نشان دهنده تاثیر قوی تر ویتامین C نسبت به ویتامین E در مقاومت در برابر استرس می باشد از اینرو تحقیق حاضر با بررسی Dabrowski در سال ۲۰۰۴ و Ishibashi در سال ۱۹۹۲ و تاکامی در سال ۲۰۰۴ همخوانی دارد.

در سال ۱۹۹۲، Ishibashi و همکارانش، اثر اسید آسکوربیک را در طوطی ماهی در شرایط استرس بررسی نمودند. بررسی آنها نشان داد ماهیان که با جیره غذایی حاوی اسیدآسکوربیک تغذیه شده بودند نسبت به استرس کمبود اکسیژن قوی تر هستند. آنها به این نتیجه رسیدند که اسیدآسکوربیک در شرایط کمبود اکسیژن از اثرات تناوبی استرس جلوگیری نموده و شرایط هایپرآکسی باعث افزایش نیاز اسیدآسکوربیک می شود.

Dabrowski و همکارانش، در سال ۲۰۰۴ تاثیر اسید آسکوربیک را در استرس اکسیژنی (هیپوکسی یا هایپرکسی)، رشد و میزان ویتامین های بافت در ماهی قزل آلا رنگین کمان بررسی نمودند. در این بررسی از سه سطح متفاوت اکسیژن محلول (هایپرکسی، هیپوکسی، نرمال اکسی) و در سه میزان متفاوت اسید آسکوربیک ۱۰، ۱۰۰، ۱۰۰۰ میلیگرم در کیلوگرم استفاده شد. این بررسی نشان داد جیره های غذایی حاوی ویتامین C تاثیرات مثبتی در رشد در شرایط هیپوکسی و نرمال اکسی دارد و همچنین در شرایط هایپرکسی باعث سرعت بخشیدن در تنزل اسید آسکوربیک بافت می شود.

تاکامی و همکاران در سال ۲۰۰۴، اثرات تغذیه ای ناپلیوس آرتمیا غنی شده با ویتامین C را روی رشد، درصد بقا و مقاومت استرس های محیطی در لاروهای قزل آلا رنگین کمان بررسی نمودند. بررسی آنها نشان داد تیماری که توسط غذای کنسانتره به علاوه آرتمیای غنی شده با ویتامین C تغذیه شده بود نسبت به تیمارهایی که فاقد ویتامین C در جیره غذایی شان بودند رشد بیشتری داشته و همچنین مقاومت در برابر استرس و درصد بقا نیز در این تیمار بیشتر از بقیه تیمارها بوده است.

در مورد اضافه کردن ویتامین C به جیره غذایی محققین در بررسی های خود به این نتیجه رسیدند که افزایش میزان این ویتامین در جیره غذایی مقاومت ماهی را در برابر استرس های مزمن (دما، اکسیژن و تراکم) بالا می برد (Henrique et al., 1998; Montero et al., 1999; Tort et al., 2004).

علت افزایش مقاومت در ماهیانی که از ویتامین C تغذیه شده اند را می توان در ذخیره شدن ویتامین C در بافت ماهیان و جلوگیری از اکسیداسیون و تخریب دانست به این صورت این ویتامین یک دفاع مضاعف در برابر استرس و عوامل بیماریزا در بدن ماهی ایجاد می کند (Lim et al., 2001; Norrgren et al., 2001). همچنین تاثیر ویتامین C در افزایش تعداد گلبول های قرمز خون، باعث انتقال و عرضه بیشتر اکسیژن در

خون ماهی و در نهایت بافت ها شده و موجب ارائه پاسخ فیزیولوژیکی بهتری در ماهی در هنگام مواجهه با عوامل استرس زا می شود (Affonso et al., 2007).

برخی از محققین اثر ویتامین E را در عملکرد سیستم ایمنی بررسی کرده اند، مثلاً در ماهی سیم دریایی gilthead افزایش ویتامین E به جیره غذایی عملکرد لوکوسیت های فاگوسیتوز کننده را بهبود بخشیده و افزایش می دهد (Ortuno et al., 2001). در گربه ماهی کانالی *Ictalurus Punctatus* استفاده از دوز بالای ویتامین E فعالیت فاگوسیت ها را افزایش داده و تولید آنیون های سوپراکسید را در لوکوسیت ها زیاد می کند (Wise et al., 1993).

این بررسی نشان داد حذف ویتامین E از جیره غذایی باعث کاهش سطح ایمنی در قزل آلا ی رنگین کمان می شود، تحقیقات گذشته روی قزل آلا (*Salmo gaudneri*) نیز توسط Blazer و همکارانش در سال ۱۹۸۴ نتایج مشابهی را نشان داد. این بررسی همچنین نتایج Belo و همکارانش را در سال ۲۰۰۵ تایید می کند آنها در بررسی خود به این نتیجه رسیده بودند که افزایش ویتامین E به میزان ۴۵۰ میلی گرم به ازای کیلو گرم غذا از افزایش کورتیزول خون در ماهیان استخوانی که در شرایط استرس ناشی از تراکم بالای پرورش قرار گرفته اند جلوگیری می کند، نتایج تحقیق حاضر نیز این نکته را تایید می کند که میزان ویتامین E تاثیر به سزایی در میزان غلظت کورتیزول در سرم خون دارد. بررسی حاضر با نتایج بررسی های مشابه:

(Pickering & Stewart, 1994), (Belo, 2005) و (Tort et al., 1996) همخوانی داشته و این نکته را تایید می کند که ماهیانی که با ویتامین E بیشتری تغذیه شده اند نسبت به گروه شاهد قدرت تطابق بیشتری نسبت به تغییرات شرایط محیطی دارند.

اثر توام ویتامین های E و C بر افزایش مقاومت سیستم ایمنی در این بررسی مشهود بود و نتایج این بررسی با نتایج Messenger و همکاران در سال ۱۹۹۸ همخوانی داشت.

Meseguer و همکاران در سال ۱۹۹۸، اثر استفاده از ویتامین E و C را در سیستم ایمنی غیر اختصاصی در ماهی سیم دریایی gilthead (*Sparus aurata L.*) بررسی نمودند. آنها در یک دوره ۴۵ روزه از چهار تیمار (شاهد، ویتامین C ۳ گرم بر کیلو گرم، ویتامین E ۱،۲ گرم بر کیلو گرم و تیمار تلفیقی) استفاده نمودند. نتیجه بررسی آنها نشان داد فعالیت فاگوسیتیک در ماهیانی که تنها از ویتامین E در جیره غذایی تغذیه کرده بودند نسبت به تیمار ویتامین C بالاتر بوده و در مقابل ماهیان تیمار ویتامین C دارای بالاترین میزان فعالیت انفجار تنفسی در گلبول های سفید خون بودند. اما بررسی آنها نشان داد استفاده تلفیقی از این دو ویتامین دارای اثر مکملی بوده است به این صورت که ماهیانی که از جیره تلفیقی تغذیه کرده بودند دارای بالاترین میزان در انفجار تنفسی در فاگوسیت ها بودند. لازم به ذکر است این تحقیق تفاوت معنی داری را در میزان رشد تیمارهای حاوی ویتامین نشان نداد.

به طور کلی پارامترهای ایمنی متأثر از میزان ویتامین E هستند. لنفوسیت ها مسئول تولید آنتی بادی و ایمنوگلوبین هستند و با تغییر در ثبات غشاء تحت تاثیر قرار می گیرند و از آنجایی که ویتامین E نقش مهمی در ثبات غشاء سلولی دارد افزایش میزان آن در جیره غذایی تاثیر مثبتی در عملکرد لنفوسیت ها دارد، گزارش ها حاکی از آن است که کمبود ویتامین E عملکرد لنفوسیت های B و T را تضعیف می نماید (Blazer, 1984). همچنین به علت تاثیر ویتامین E در عملکرد غشاء سلولی در زمان تحریک ایمنی نیاز بدن ماهی به آن بیشتر می شود (Jacob, 1995). عملکرد ویتامین E، به عنوان یک آنتی اکسیدان، با ویتامین C در ارتباط می باشد، در زمانی که ویتامین E به عنوان یک آنتی اکسیدان عمل می کند شکل فعال آن آلفاتوکوفرول^{۳۹} به شکل رادیکال^{۴۰} تبدیل می شود و ویتامین C به آن کمک می کند که از شکل رادیکال دوباره به شکل فعال تبدیل شود (Jacob, 1995).

در مورد استفاده تلفیقی از ویتامین E و C بررسی ها نشان می دهد اضافه کردن این ویتامین ها به جیره غذایی باعث بالا رفتن تولید آنتی بادی و افزایش فعالیت فاگوسیتوز و ارتقا مقاومت در برابر عفونت های باکتریایی (Montero et al, 2001; Ortuno et al., 2003) و همچنین افزایش مقاومت ماهی در برابر استرس و عوامل استرس زا (Li and Lovell, 1985; Hanrique, 1998; Ortuno et al., 2003) می شود.

نتایج این بررسی اثرات مثبت ویتامین E و ویتامین C موجود در جیره غذایی را به عنوان محرک ایمنی و اثر آنها در ارتقاء مقاومت برای ادامه حیات اثبات می کند.

در این تحقیق میزان گلوکز خون ماهیان نیز بعد از استرس اندازه گیری شد. نتیجه بررسی غلظت گلوکز تفاوت معنی داری را بین تیمارهای تلفیقی و تیمار شاهد نشان داد ($P < 0.05$). به این صورت که تیمارهای تلفیقی F و E به ترتیب با ۷۸,۶۶ میلی گرم بر دسی لیتر^{۴۱} و ۸۱,۶۶ میلی گرم بر دسی لیتر کمترین میزان گلوکز خون بعد از استرس را داشتند ولی تفاوت معنی داری بین تیمارهای غیر تلفیقی با تیمار شاهد دیده نشد.

میزان غلظت گلوکز در پلاسمای خون ماهی در شرایط مختلف فیزیولوژیکی ممکن است تغییر یابد Leatherland در سال ۱۹۸۱ و Andersen در سال ۱۹۹۹ در بررسی خود روی ماهی قزل آلا رنگین کمان به این نتیجه رسیدند که ماهیانی که تحت شرایط استرس کورتیزول خونشان افزایش یافته است ممکن است میزان گلوکز خونشان بالا یا پایین رفته و یا حتی بدون تغییر بماند. از آنجاییکه ارزیابی گلوکز تنها می تواند یک تصویر لحظه ای از شرایط سوخت و ساز ماهی نشان دهد تنها به عنوان یک نشانگر ثانویه و در ارتباط

^{۳۹} α -Tocopherol
^{۴۰} Tocopheroxyl radical
^{۴۱} mg/dl

با کورتیزول مورد استفاده قرار گیرد. میزان گلوکز تحت تاثیر عوامل متعددی قرار گرفته و ممکن است هر گونه تغییرات کورتیزول را پنهان کند (Mommsen *et al.*, 1999).

همان طور که می دانیم پارامترهای خونی به عنوان شاخص های فیزیولوژیکی در پاسخ به تغییرات خارجی یا داخلی در ماهیان مورد استفاده قرار می گیرند (Cataldi *et al.*, 1998). تغییر فاکتورهای خونی و بیوشیمیایی در فصول مختلف و در نتیجه تغذیه با جیره های غذایی مختلف و بیماریها ثابت شده است (Aldrin *et al.*, 1982).

همین طور یکی از راههای تشخیص بیماری در ماهیان نیز مطالعات خون شناسی است. لذا یکی از راههای کنترل وضعیت فیزیولوژی ماهیان از نقطه نظر رشد، بیماری و حتی باروری، ارزیابی شاخص های خونی در آنهاست (بهمنی، ۱۳۸۷). اصولاً پارامتر های خونی نشانه ای از وضعیت فیزیولوژیک موجود بوده و میتواند تحت تأثیر مواد غذایی خورده شده توسط جاندار باشند (Waagbo *et al.*, 1998; Hemre *et al.*, 1995; Klinger *et al.*, 1996; Kumar *et al.*, 2005).

در این تحقیق در پایان دوره آزمایش ماهیان به طور تصادفی از تیمارهای تبیین شده انتخاب و خونگیری انجام گردید و تمامی شاخص های خونی برای هر نمونه اندازه گیری گردید. در شمارش سلول های خونی بالاترین میزان گلبول های قرمز خون RBC در تیمارهایی مشاهده شد که دارای ویتامین C بودند اما تفاوت معنی داری بین تعداد گلبول های قرمز خون در ماهیانی که تنها ویتامین E یا C را دریافت کرده بودند با تیمار شاهد مشاهده نشد ($P>0.05$). در این بررسی تیمار E با $1 \times 10^4 / \text{mm}^3$ و تیمار F با $1.09 \times 10^4 / \text{mm}^3$ بالاترین و تیمار شاهد با $0.49 \times 10^4 / \text{mm}^3$ کمترین تعداد گلبول های قرمز را داشتند و تفاوت معنی داری بین این تیمارها دیده شد ($P<0.05$).

نتایج این بررسی مشابه بررسی Montero و همکارانش در سال ۲۰۰۱ بود که در بررسی خود با استفاده از جیره های متفاوت ویتامین E در *S. aurata* تغییری را در میزان گلبول های قرمز گزارش نکرده است. Montero و همکارانش در سال ۲۰۰۱ اثر استفاده از ویتامین E را در *S. aurata* بررسی کردند. نتایج بررسی آنها نشان داد که میزان ویتامین E تاثیر محسوسی در میزان هماتوکریت و تعداد گلبول های قرمز این گونه ندارد (Montero *et al.*, 2001).

در بررسی حاضر بالاترین میزان گلبول های قرمز و هماتوکریت و هموگلوبین مربوط به تیمارهای تلفیقی و تیمارهای شامل ویتامین C بود. اما تغییر معنی دار تنها بین تیمارهای تلفیقی با تیمار شاهد بدست آمد ($P<0.05$). همانطور که می دانیم کمبود ویتامین C باعث ایجاد آنمی در ماهیان می شود که در نتیجه آن میزان هماتوکریت، هموگلوبین و تعداد گلبول های قرمز کاهش می یابد (Adham *et al.*, 2000). افزایش تعداد گلبول های قرمز با اضافه شدن مقادیر ویتامین C می تواند به علت اثر مستقیم ویتامین C بر روی

اریتروپوئیزیس باشد (Dinning, 1962; Cox, 1978) زیرا ویتامین C جهت رهاسازی آهن متصل شده فریتین از کبد جهت استفاده آهن در فرایند اریتروپوئیزیس ضروری است (Mazur *et al.*, 1960).

با توجه به اینکه تقریباً تمامی اکسیژنی که در خون حیوانات حمل می گردد، به هموگلوبین موجود در گلبول های قرمز خون متصل می باشد (محمدی، ۱۳۸۵) و یک گلبول قرمز اساساً شامل غشایی است که محلولی از هموگلوبین را در بر می گیرد (هموگلوبین حدود ۹۵ درصد پروتئین داخل سلولی گلبول قرمز را شامل می گردد) (محمدی، ۱۳۸۶). از اینرو شباهت نتایج به دست آمده از اندازه گیری میزان هموگلوبین با نتایج حاصل از شمارش تعداد گلبول های قرمز، رابطه ای منطقی می باشد. هموگلوبین حاوی مولکول "هم" می باشد که یک تتراپیرول حلقوی متشکل از چهار مولکول پیرولی اتصال یافته توسط پل های α -متیلن می باشد. یک اتم یون فرو (Fe^{+2}) در مرکز این تتراپیرول مسطح قرار دارد (محمدی، ۱۳۸۶).

نقش فقدان ویتامین C در بروز آنمی هنوز به طور دقیق شناخته نشده است. در هر حال در برخی گونه ها، این امر می تواند هم به دلیل همراهی کاهش جذب جیره و یا نقش این ویتامین در متابولیسم آهن باشد. فقدان ویتامین C، فریک هموگلوبین را به فروس تبدیل کرده و بنابراین با حمل پلاسما و جذب سلولی آهن همراه است (Lipschitz *et al.*, 1971). این ویتامین همچنین می تواند به عنوان تسهیل کننده جذب آهن در جیره عمل کند. فقدان ویتامین C می تواند باعث آسیب آهن رها شده از ذخایر رتیکو-اندوتلیال شده و بنابراین جلوی سنتز اریتروسیت ها را گرفته و باعث توسعه آنمی گردد (Hilton *et al.*, 1978).

ایمنی سلولی در ماهیان بیشتر مربوط به لکوسیتها (گلبولهای سفید) می باشد (Magnadottir, 2009). ارتقاء عملکرد دفاعی ماهی در برابر عوامل بیماری زا، بهترین نحوه پرورش ماهی سالم است. گلبول سفید به عنوان یکی از عوامل اصلی دفاع در برابر عوامل ناخواسته در بدن محسوب می شود. نوسان تعداد هر کدام از فاکتورهای خونی با توجه به وضعیت فیزیولوژیکی بدن می تواند شاخص مناسبی برای ارزیابی وضعیت ایمنی ماهیان محسوب شود (Hrubec *et al.*, 2001).

گلبول های سفید ماهیان در عمل فاگوسیتوز و پاسخ ایمنی بدن نسبت به عوامل انگلی، باکتریایی و ویروسی و کمک به ترمیم بافت های صدمه دیده نقش مهمی ایفا می کنند. اندازه گیری گلبولهای سفید، درصد و نوع آنها در تعیین وضعیت عمومی ماهی کاربرد فراوانی می تواند داشته باشد (شاهسونی و همکاران، ۱۳۷۸) بر اساس مطالعات انجام گرفته در برخی از گونه های ماهی، دامنه تغییرات انواع گلبول سفید در خون بسیار متفاوت است (Feldman *et al.*, 2000). تعداد گلبولهای سفید و نسبت انواع آنها یکی از شاخصهای مهم سلامتی و وضعیت سیستم ایمنی در جانوران می باشد (Shalaby *et al.*, 2006). محرک های سیستم ایمنی موادی هستند که گلبولهای سفید خون را فعال می کنند (Raa, 2000).

تعداد گلبول های سفید نیز همراه با نسبت انواع آنها از شاخص های مهم سلامت و وضعیت سیستم ایمنی در جانوران به شمار می رود در ضمن این سلول ها قابلیت بالایی در انباشت ویتامین C نیز دارند (Shalaby et al., 2006). در تحقیق حاضر بالاترین تعداد گلبول های سفید خون مربوط به تیمارهای تلفیقی و تیمارهای حاوی ویتامین C بود که تفاوت معنی داری با تیمار شاهد نشان دادند. ماهیان تیمار تلفیقی E با داشتن $69/83 \times 10^4 / \text{mm}^3$ دارای بالاترین تعداد گلبول های سفید و تیمار شاهد با $28/8 \times 10^4 / \text{mm}^3$ دارای کمترین تعداد گلبول های سفید بودند، از اینرو بررسی حاضر با بررسی Affonso در سال ۲۰۰۷ همخوانی دارد.

Affonso و همکارانش در سال ۲۰۰۷، اثر استفاده از ویتامین های E و C را در فاکتورهای خونی (*Arapaima gigas*) بررسی کردند. آنها در بررسی خود از ۷ تیمار (تیمار شاهد، ۳ تیمار شامل ۱۲۰۰، ۸۰۰، ۵۰۰ میلیگرم ویتامین C و ۳ تیمار شامل ۱۲۰۰، ۸۰۰، ۵۰۰ میلیگرم ویتامین E) استفاده نمودند. نتایج بررسی آنها نشان داد بالا بردن میزان ویتامین E تاثیری در تعداد گلبول های سفید خون ندارد، اما بالا بردن ویتامین C و یا ویتامین E باعث افزایش تعداد گلبول های قرمز و هماتوکریت این گونه می شود. Verlhac و همکارانش در بررسی خود به این نتیجه رسیدند که بالا بردن میزان ویتامین C حتی تا میزان ۴۰۰۰ میلیگرم به ازای کیلوگرم غذا در ماهی قزل آلا رنگین کمان باعث ازدیاد لوکوسیت های خون این گونه می شود (Verlhac et al., 2001). اما در مورد ویتامین E این موضوع بالعکس گزارش شده است. برخی از محققین در بررسی خود به این نتیجه رسیده اند که بالا بردن میزان ویتامین E در جیره غذایی به میزان ۱۰۰۰ میلیگرم در ازای کیلوگرم غذا باعث اثرات منفی یعنی کم شدن ایمنوگلوبین ها یا فعالیت فاگوسیتوز لوکوسیت ها (Puangkaew et al., 2004; Kiron et al., 2004) و کم شدن تعداد گلبول های سفید در خون می شود که در نتیجه باعث افزایش میزان آسیب پذیری جاندار در برابر بیماری می شود (Puangkaew et al., 2004).

۵-۲- پیشنهادات

- ۱) مشابه این بررسی را می توان بر روی نانو ذره ها و یا دیگر ویتامین ها برای گونه قزل آلا رنگین کمان انجام داد.
- ۲) از آنجاییکه استفاده از این ویتامین ها هزینه تولید را بالا می برد (به علت گران بودن) توصیه می شود استفاده از چنین جیره هایی برای مولدین و بچه ماهی صورت پذیرد.
- ۳) مشابه این بررسی می تواند برای دیگر گونه های با ارزش تجاری مثل آزاد ماهیان، ماهیان خاویاری و غیره انجام شود.

- (۴) اثر دوزهای بالاتر این ویتامین ها نیز می تواند بررسی شود تا احتمال تاثیر منفی در میزان های بالاتر از حد نیاز نیز مشخص شود.
- (۵) اثرات تلفیقی این ویتامین ها بر تولیدمثل ، قابلیت باروری تخم و دیگر اعمال حیاتی و زیستی این گونه نیز می تواند مورد بررسی قرار گیرد.
- (۶) به طور کل اثرات ویتامین ها و نانو ذره ها و دیگر افزودنی ها بیشتر در محیط های آزمایشگاهی مورد سنجش قرار گرفته توصیه می شود بررسی های بیشتری در محیط های پرورشی نیز صورت پذیرد.

۵-۳- نتیجه گیری

- (۱) به طور کل ماهیان تیمار E که از میزان ۵۰ میلیگرم در کیلوگرم غذا ویتامین E و C به صورت تلفیقی تغذیه شده بودند دارای بهترین شاخص های رشد بودند. می توان علت این افزایش رشد را در نتیجه اثر همپوشانی دو ویتامین در ارتقا این فاکتورها دانست. تاثیر ویتامین C ، به عنوان یک کوانزیم ضروری ، در اکسیداسیون تیروزین و فنیل آلانین و همچنین اثر این ویتامین در سنتز کلاژن به همراه اثر ویتامین E به عنوان کوفاکتور بر آنزیم های چرخه کربس را میتوان دلیل افزایش فاکتورهای رشد در جیره های تلفیقی دانست.
- (۲) نتایج حاصل از بررسی فوق نشان داد که سرعت رشد ویژه و درصد افزایش وزن بدن طی ۶۰ روز پرورش تحت تاثیر سطوح مختلف ویتامین C و E جیره بوده و تیمار E با گروه شاهد تفاوت معنی دار آماری داشته است، درحالیکه سایر تیمارها با گروه کنترل اختلاف معنی دار آماری نداشتند. در مطالعه فوق ضریب تبدیل غذا در تیمار E با ۱/۱۷ کمترین میزان و نسبت به تیمار شاهد با ۲/۳۰ تغییر معنی داری نشان دادند.
- (۳) میتوان نتیجه گرفت که میزان ۵۰ به ۵۰ این دو ویتامین بهترین نسبت برای تغذیه قزل آلاهی رنگین کمان می باشد. نسبت ۵۰ میلیگرم از هر کدام از ویتامین ها به صورت تلفیقی از میزان ۱۰۰ گرم از آنها برای تغذیه قزل آلاهی رنگین کمان مناسبتر بوده و میزان رشد و مقاومت در برابر استرس را به صورت محسوسی بهبود بخشیده است.
- (۴) این بررسی نشان داد افزایش ویتامین E و C در جیره باعث بالا رفتن تعداد گلبول ها و تقویت غشا سلولی آنها و در نتیجه بالا رفتن سطح ایمنی و مقاومت ماهی می گردد.
- (۵) در بررسی حاضر بالاترین میزان گلبول های قرمز و هماتوکریت و هموگلوبین مربوط به تیمارهای تلفیقی و تیمارهای شامل ویتامین C بود که تغییر معنی داری بین تیمارهای تلفیقی و تیمار شاهد بدست آمد. بالاترین میزان گلبول های قرمز خون RBC در تیمارهایی مشاهده شد که دارای ویتامین C بودند، این افزایش را می توان به اثر مستقیم ویتامین C بر روی اریتروپوئیس نسبت داد.

۶) اثر ذخیره شدن ویتامین C در بافت ماهیان و جلوگیری از اکسیداسیون و تخریب و ایجاد یک دفاع مضاعف در برابر استرس و عوامل بیماریزا در بدن ماهی به همراه اثر مثبت ویتامین E در عملکرد لوکوسیت‌های فاگوسیتوز کننده به صورت توانمند باعث گردید تا بالاترین میزان مقاومت در برابر استرس درجه حرارت در ماهیان تیمارهای تلفیقی مشاهده شود.

۷) ارتقا و بهبود شاخص های رشد و فاکتورهای خونی و همچنین بالا رفتن سطح مقاومت در برابر استرس در تیمارهای تلفیقی را می توان به ارتباط عملکرد ویتامین E به عنوان یک آنتی اکسیدان با ویتامین C مرتبط دانست. در زمانی که ویتامین E به عنوان یک آنتی اکسیدان عمل می کند شکل فعال آن آلفاتوکوفرول به شکل رادیکال تبدیل می شود و ویتامین C به آن کمک می کند که از شکل رادیکال دوباره به شکل فعال تبدیل شود.

پیوست

پیوست الف-۱- درصد افزایش وزن در تیمارها در پایان دوره (نمودار ۴-۱)

تیمار	A	B	C	D	E	F	G
WG	۱۳۲/۷	۱۴۰/۴	۱۳۸/۹	۱۵۰/۳	۱۶۵	۱۴۵/۶	۱۱۷/۵
STVD	۲/۴۵۹۴	۱۶/۵۸۴۹	۵/۹۹۳۳	۱۴/۰۱۷۶	۹/۴۱۱۶	۲۲/۶۹۱۵	۲/۸۶۶۶

پیوست الف-۲- ضریب رشد ویژه در تیمارها در پایان دوره (نمودار ۴-۲)

تیمار	A	B	C	D	E	F	G
SGR	۱/۴۰۷۷	۱/۴۵۹۵	۱/۴۵۱۷	۱/۵۲۸۰	۱/۶۲۳۸	۱/۴۹۳۱	۱/۲۹۵۵
STVD	۰/۰۱۷۶	۰/۱۱۵۷	۰/۰۴۲۱	۰/۰۹۳۷	۰/۰۵۹۶	۰/۱۵۰۳	۰/۰۲۱۹

پیوست الف-۳- ضریب چاقی در تیمارها در پایان دوره (نمودار ۴-۳)

تیمار	A	B	C	D	E	F	G
CF	۰/۵۴۰۹	۰/۴۹۸۵	۰/۵۲۰۹	۰/۵۳۴۹	۰/۵۰۰۱	۰/۵۱۸۴	۰/۶۱۲۶
STVD	۰/۰۱۰۹	۰/۰۳۸۱	۰/۰۳۴۲	۰/۰۳۲۳	۰/۰۰۳۲	۰/۰۳۵۲	۰/۰۶۴۵

پیوست الف-۴- ضریب بازده پروتئین در تیمارها در پایان دوره (نمودار ۴-۴)

	A	B	C	D	E	F	G
PER	۱/۱۵۵۳	۱/۲۳۵۲	۱/۱۹۲۴	۱/۲۶۶۵	۱/۴۱۲۲	۱/۲۷۰۴	۱/۰۸۳۶
STVD	۰/۰۱۳۲	۰/۱۱۹۱	۰/۰۲۴۳	۰/۱۰۹۶	۰/۰۷۶۱	۰/۱۵۹۹	۰/۰۲۸۹

پیوست الف-۵- ضریب تبدیل غذایی در تیمارها در پایان دوره (نمودار ۴-۵)

تیمار	A	B	C	D	E	F	G
FCR	۱/۴۶۳۹	۱/۵۳۶۹	۱/۹۹۷۱	۱/۸۸۳۶	۱/۱۷۳۷	۱/۳۹۷۴	۲/۳۰۸۴
STVD	۰/۰۲۴۸	۰/۲۰۳۱	۰/۰۳۸۵	۰/۱۶۹۷	۰/۰۹۷۸	۰/۲۳۳۴	۰/۱۹۸۹

پیوست الف-۶- درصد کارایی تبدیل غذا در تیمارها در پایان دوره (نمودار ۴-۶)

تیمار	A	B	C	D	E	F	G
FCE	۴۶/۲۱	۴۹/۴۱	۴۷/۶۹	۵۰/۶۶	۵۶/۴۸	۵۰/۸۱	۴۳/۳۴
STVD	۰/۵۲۸	۴/۷۶۶	۰/۹۷۱	۴/۳۸۷	۳/۰۴۶	۶/۳۹۸	۱/۱۵۷

پیوست الف-۷- درصد میانگین رشد روزانه تیمارها در پایان دوره (نمودار ۴-۷)

تیمار	A	B	C	D	E	F	G
ADG	۲/۲۸۳	۲/۳۶۶	۲/۳۵۴	۲/۵۱	۲/۷۵	۲/۴۸	۱/۹۵
STVD	۰/۱۶۰۷	۲/۶۴۵۷	۱/۰۱۳۷	۲/۶۹۴۳	۲/۷۵۳۷	۰/۵۳۵۷	۰/۳۷۵۶

پیوست الف-۸- درصد ضریب رشد روزانه در تیمارها در پایان دوره (نمودار ۴-۸)

تیمار	A	B	C	D	E	F	G
DGR	۱/۳۸۹۱	۱/۴۴۲۸	۱/۳۹۵۹	۱/۵۱۳۷	۱/۶۲۸۲	۱/۴۹۹۰	۱/۲۵۵۸
STVD	۰/۰۰۹	۰/۱	۰/۰۱۴	۰/۰۹۲۸	۰/۰۷۱۴	۰/۱۰۴۰	۰/۰۱۷۹

پیوست الف-۹- درصد رطوبت لاشه در تیمارها در پایان دوره (نمودار ۴-۹)

تیمار	A	B	C	D	E	F	G
رطوبت	۶۵/۳۶	۶۵/۰۶	۶۵/۷۳	۶۵/۵۳	۶۴/۴۶	۶۴/۶۶	۶۹/۷
STVD	۱/۱۵۱	۱/۴۴	۰/۶۰۷	۰/۷۲۵	۰/۲۸۰	۰/۲۴۱	۰/۶۲۴

پیوست الف-۱۰- درصد پروتئین لاشه در تیمارها در پایان دوره (نمودار ۴-۱۰)

تیمار	A	B	C	D	E	F	G
پروتئین	۲۵/۳۲	۲۵/۶۲	۲۵/۴۴	۲۶/۰۸	۲۷/۱۴	۲۶/۸۸	۲۲/۲۹
STVD	۰/۸۵۰	۰/۵۰۴	۰/۲۲۴	۰/۳۰۰	۰/۷۸۳	۰/۸۶۰	۰/۷۲۰

پیوست الف-۱۱- درصد چربی لاشه در تیمارها در پایان دوره (نمودار ۴-۱۱)

تیمار	A	B	C	D	E	F	G
درصد چربی	۶/۰۹	۶/۵۹	۶/۵۳	۶/۱۸	۶/۰۲	۶/۲	۵/۱
STVD	۰/۳۵	۰/۴۵	۰/۲۳	۰/۲۰	۰/۱۱	۰/۲۰	۰/۱۰

پیوست الف-۱۲- درصد خاکستر لاشه در تیمارها در پایان دوره (نمودار ۴-۱۲)

تیمار	A	B	C	D	E	F	G
درصد خاکستر	۱/۱۴	۱/۱۶۳	۱/۱۴۵	۱/۱۵	۱/۱۵۵	۱/۱۶	۱/۱۴۳
STVD	۰/۳۱۳۹	۰/۲۵۰	۰/۳۰۱	۰/۱۵	۰/۳۹۵	۰/۲۵۰	۰/۲۱۶

پیوست الف-۱۳- درصد هماتوکریت خون ماهیان در پایان دوره (نمودار ۴-۱۳)

تیمار	A	B	C	D	E	F	G
هماتوکریت	۳۵/۰۸	۳۶/۵	۳۵	۳۴/۵	۴۵/۱۶	۳۸/۶۶	۲۱/۵۸
STVD	۹/۷۳	۱۱/۵۷	۷/۳۹	۷/۴۴	۷/۴۶	۱۰/۳۰	۱/۰۲

پیوست الف-۱۴- تعداد گلبول های قرمز خون RBC ماهیان در پایان دوره (نمودار ۴-۱۴)

تیمار	A	B	C	D	E	F	G
RBC	۰/۸۲۳۳	۰/۸۳۸۳	۰/۸۰۵	۰/۸۲۶۷	۱/۱۱	۱/۰۹	۰/۴۹
STVD	۰/۳۳۸۰	۰/۲۷۱۹	۰/۲۵۶۷	۰/۲۲۲۵	۰/۴۰۴۷	۰/۳۸۴۸	۰/۷۲۶

پیوست الف-۱۵- تعداد گلبول های سفید خون ماهیان در پایان دوره (نمودار ۴-۱۵)

تیمار	A	B	C	D	E	F	G
WBC	۴۷/۳۳	۴۸/۱۷	۳۹	۳۸/۸۳	۶۹/۸۳	۶۳/۸۳	۲۸/۸۳
STVD	۱۱/۸۶	۱۱/۱۰	۱۸/۰۲	۱۷/۸۲	۸/۷۵	۹/۸۰	۵/۰۷

پیوست الف-۱۶- درصد لنفوسیت خون ماهیان در پایان دوره (نمودار ۴-۱۶)

تیمار	A	B	C	D	E	F	G
درصد لنفوسیت	۸۵/۳۳	۸۲/۳۳	۸۸	۸۸	۸۹	۹۲/۳۳	۷۵
STVD	۴/۹۵	۲/۱۲۱	۰/۷۰	۲/۱۲	۱/۴۱	۰/۶	۷/۰۷

پیوست الف-۱۷- درصد منوسیت خون ماهیان در پایان دوره (نمودار ۴-۱۷)

تیمار	A	B	C	D	E	F	G
درصد منوسیت	۸/۳۳	۱۱	۴	۶/۳۳	۸/۳۳	۷	۱۵/۶۶
STVD	۷/۷۷۸	۲/۸۲۸	۲/۱۲۱	۰/۷۰۷	۲/۸۲۸	۲/۱۲۱	۹/۱۹۲

پیوست الف-۱۸- غلظت کورتیزول سرم خون بعد از استرس حرارتی (نمودار ۴-۱۸)

تیمار	A	B	C	D	E	F	G
کورتیزول	۲۴۳/۴۱	۲۲۹/۳۷	۲۶۷/۷۹	۲۴۸/۲۲	۲۱۰/۸۲	۱۸۸/۷۴	۲۸۵/۱۱
STVD	۲۴/۶۱	۵/۵۲	۱۸/۴۳	۱۱/۳۵	۲۸/۳۴	۸/۹۸	۷/۷۷

پیوست الف-۱۹- غلظت گلوکز (میلیگرم بر دسی لیتر) سرم خون بعد از استرس حرارتی (نمودار ۴-۱۹)

تیمار	A	B	C	D	E	F	G
گلوکز	۹۵	۹۲/۶۶	۱۰۹/۶۶	۹۶	۸۱/۶۶	۷۸/۶۶	۱۳۶
STVD	۵	۷/۵۰	۳۴/۵۳	۱۲/۱۶	۱۶/۰۷	۱۸/۵۸	۲۲/۵۳

منابع فارسی :

- ۱ - بشارت، الف. و نظافتی، الف.، ۱۳۷۱. جزوه آموزشی دوره تکمیلی پرورش ماهیان سردابی، معاونت تکثیر و پرورش آبزیان. اداره کل آموزش و ترویج. ۱۰۶ ص.
- ۲ - پیغان، ر.، داودی، ف. و عباسی، س.، ۱۳۷۵. بررسی مورفولوژی سلولهای خونی، تعیین درصد گلبولهای سفید ماهی کپور معمولی، کپور علفخوار و کپور نقره ای در استان خوزستان. مجله پژوهش و سازندگی، شماره ۳۲ / پ ۷۵، صفحات ۱۲۳-۱۲۵.
- ۳ - تاتینا، م.، طاعتی، ر.، بهمنی، م.، سلطانی، م. و قریب خانی، م.، ۱۳۸۸. اثر سطوح متفاوت ویتامین های E و C بر شاخص های رشد و بقای ماهی استرلیاد پرورشی. مجله علمی شیلات ایران. سال ۲۱. شماره ۱. صفحات ۲۳-۳۰.
- ۴ - تاکامی، ق.، مشکینی، س.، رسولی، ع. و امینی، ف.، ۱۳۸۳. بررسی اثرات تغذیه ای ناپلیوس های *Artemia urmiana* غنی شده با ویتامین C روی رشد، درصد بقا و مقاومت در برابر استرس های محیطی در لاروهای قزل آلا ی رنگین کمان. فصلنامه پژوهش و سازندگی. شماره ۶۶. صفحات ۲۵-۳۲.
- ۵ - ستاری، م.، ۱۳۸۱. ماهی شناسی ۱ تشریح و فیزیولوژی، انتشارات نقش مهر. ۶۵۹ ص.
- ۶ - شاهسونی، د.، وثوقی، غ. و خضرائی نیا، پ.، ۱۳۸۰. تعیین برخی از شاخص های خونی ماهیان خاویاری انگشت قد (قره برون و ازون برون) در استان، مجله پژوهش و سازندگی، سال ۱۴، جلد ۱، شماره ۵۰، صفحات ۱۴-۱۸.
- ۷ - فلاحتکار، ب.، سلطانی، م.، ابطحی، ب.، کلباسی، م.، پورکاظمی، م.، یاسمی، م.، ۱۳۸۵. تأثیر ویتامین C بر برخی پارامترهای رشد، نرخ بازماندگی و شاخص کبدی در فیل ماهیان (*Huso huso*) جوان پرورشی. مجله پژوهش و سازندگی در امور دام و آبزیان. شماره ۷۲. صفحه ۹۸ تا ۱۰۳.
- ۸ - محمدی، ر.، ۱۳۸۵. ترجمه اصول بیوشیمی لنینجر (جلد اول). نوشته مایکل ام. کاکس و دیوید ال. نلسون. انتشارات آبیژ. ۵۵۴ ص.
- ۹ - محمدی، ر.، ۱۳۸۶. ترجمه بیوشیمی پزشکی هارپر (ویرایش بیست و هفتم). نوشته رابرت مورای، داریل ک. گرار و ویکتور و. رادول. انتشارات آبیژ. ۸۸۰ ص.

References

- 1- Adham, K. G., Hashem, H. O., Abu-Shabana, M. B., Kamel. A. H., 2002. Vitamin C deficiency in the catfish *Clarias gariepinus*. *Aquac. Nutr.* 6: pp.129–139.
- 2- Affonso, E., Marcon, J., Tavares-Dias, M., Urbinati, E., Roubach, R., Brasil, E., Menezes, G., Ono, E. and De Andrade, E., 2007. Influence of diets supplemented with vitamins C and E on pirarucu (*Arapaima gigas*) blood parameters. *Elsevier. Comparative Biochemistry and Physiology, Part A*, 146: pp.576–580.
- 3- Aldrin, J. F., J. L. Messenger and S. Saleun, 1982. Analyses sanguineuses de turbots d'élevages immature (*Scophthalmus maximus* L.). *Aquaculture*, 40: 17-25.
- 4- Anderson, J. S., Sunderland, R., 2002. Effect of extruder moisture and dryer processing temperature on vitamin C and E and astaxanthin stability. *Aquaculture*, 207: pp.137–149.
- 5- Andersen, D. E., Reid, S. D., Moon, T. W. and Perry, S. F., (1991). Metabolic effects associated with chronically elevated cortisol in rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*). *Canadian Journal of Fisheries and Aquatic Science*, 48: pp.1811–1817.
- 6- AOAC. 1990. In: W. Horwitz (Ed). Official Methods of Analysis of Official analytical Chemists (AOAC). Vol.1, 15th ed. Assoc. Official Analytical Chemists, ashington DC, 1963P.
- 7- Abdel-Tawwab, M., Shalaby, A. M. E., Ahmed, M. H. and Khattab, Y. A., 2001. Effect of supplement dietary L- ascorbic acid (vitamin C) on mercury intoxication and growth performance of Nile tilapia (*Oreochromis niloticus* L.). *Annals of Agric. Sci. Moshtoher.*, 39 (2): pp. 961- 973.
- 8- Ai, Q. H., Mai, K. S., Zhang, C. X., Xu, W., Duan, Q. Y., Tan, B. P., and Liufu, Z. G., 2004. Effects of dietary vitamin C on growth and immune response of Japanese Seabass (*Lateolabrax japonicus*). *Aquaculture*, 242: pp.489-500 .
- 9- Aguirre, P., Gatlin III, D.M., 1999. Dietary vitamin C requirement of red drum *Sciaenops ocellatus*. *Aquac. Nutr.* 5: pp. 247–249.
- 10- Alexis, M. N., Nengas, I., Fountoulaki, E., Papoutsis, E., Andriopoulou, A., Koutsodimou, M. and Gaubaudan, J., 1999. Tissue ascorbic acid levels in European sea bass (*Dicentrarchus labrax*) and gilthead sea bream (*Sparus aurata* L.) fingerlings fed diets containing different forms of ascorbic acid. *Aquaculture*, 17: pp. 447–456.
- 11- Azad, I. S., Dayal, J. S., Poornia, M., and Ali, S. A. 2007. Supra dietary level of vitamins C and E enhance antibody production and immune memory in juvenile milkfish, *Chanos chanos* to formalin-killed *Vibrio vulnificus*. *fish shellfish immunol*, 23: pp.154-163.
- 12- Barton, B. A., 2002. Stress in fishes: A diversity of responses with particular reference to changes in circulating corticosteroids. *Integ Comp Biol.* 42: pp.517-525.
- 13- Barton, B. A. and Iwama, G. W., 1991. Physiological changes in fish from stress in aquaculture with emphasis on the response and effects of corticosteroids. *Annual Review of Fish Disease*, 1: pp. 3–26.
- 14- Belo, M. A. A., Schalch, S. H. C., Moraes, F. R., Soares, V. E., Otoboni, A. M. M. B. and Moraes, J. E. R., 2005. Effect of dietary supplementation with vitamin E and stocking density on macrophage recruitment and giant cell formation in the teleost fish, *Piaractus mesopotamicus*. *J. Comp. Pathol.* 133: pp. 146–154.
- 15- Bilen, S., Bulut, M. and Muge Bilen, S., 2011. Immunostimulant effects of *Cotinus coggyria* on rainbow trout . *Fish & Shellfish Immunology* . *Elsevier*, volume 30: pp.451-455.

- 16-Blazer, V.S. and Wolke, R.E.,1984. The effects of α -tocopherol on the immune response and nonspecific resistance factors of rainbow trout (*Salmo gairdneri* Richardson). *Aquaculture*, 37:pp.1–9.
- 17-Bouck, G.R. and Ball, R.C., 1996. Influence of capture methods on blood characteristics and mortality in rainbow trout. *Trans. Am. Fish. Soc.* 95:pp.170-176.
- 18-Cataldi, E., Di Marco, P., Mandich, A., and Cataudella, S., 1998. Serum parameters of Adriatic sturgeon *Acipenser naccarii* (*Pisces Acipenseriformes*) effects on Temperature and stress. *Comp. Biochem. Physiol.* 121:pp. 351-354.
- 19-Chagas, E. C., Mesquita-Saade, L. F. B., Aride, T. H. R., Mendes, F. A., Almeida-Val, V. Ma. F. and Val, A. L., 2003. Vitamins C, D and E in fish. In: Val, A.L., Kapoor, B.G. (Eds.), *Fish Adaptation*. Science Publishers, USA: pp. 141–178.
- 20-Cuesta, A., Esteban, M. A. and Meseguer, J., 2002. Natural cytotoxic activity in seabream (*Sparus aurata* L.) and its modulation by vitamin C. *Fish Shellfish Immunol.* 13:pp. 97–109.
- 21-Chávez de Martínez, M .C., 1990. Vitamin C requirement of the Mexican native cichlid *Cichlasoma urophthalmus* (Gunther). *Aquaculture*, 86:pp. 409–416.
- 22-Chew, B. P., 1995. Antioxidant vitamins affect food animal immunity and health. *J. Nutri.*, 125:pp. 18045- 18085.
- 23-Chien, L. T., Hwang, D. F. and Jeng, S. S., 1999. Effect of thermal stress on dietary requirement of vitamin C in Thornfish *Terapon jarbua*. *Fish. Sci.* 65: pp.731–735.
- 24-Craig, S., Helfrich., 2009. *Understanding Fish Nutrition, Feed and Feeding*. Publication; pp. 420-256.
- 25-Feldman, B.G., Zinkl, J.G., Jain, N.C. (Eds.), 2000. *Schalm's Veterinary Hematology*, Wfth ed. Lippincott Williams & Wilkins, Baltimore, MD,p. 1376.
- 26-Gatta, P. P, Pirini, M., Testi, S., Vignola, G. and Monetti, P.G., 2000. The influence of different levels of dietary vitamin E on sea bass *Dicentrarchus labrax* fleshquality. *Aquaculture Nutrition*, 6:pp. 47-52.
- 27-Girri, S. S., Sahoo, S. K., SHU, B. B., Sahu, A. K., Mohanty, S. N., Mohanty, P. K., and Ayyappan, S., 2002. Larval survival and growth in *Wallago attu* (Bloch and Schneider): effects of light. Photoperiod and feeding regimes *.Aquaculture*. 213:pp.157-161.
- 28-Goede, R. W., Barton, B. A., 1990. Organismic indices and an autopsybased Assessment as indicators of health and condition of fish. *Am. Fish. Soc. Symp.* 8:pp. 93–108.
- 29-Hardie, L. J., Fletcher, T.C. and Secombes, C. J., 1991.The effect of dietary vitamin C on the immune response of the Atlantic salmon (*Salmo salar* L.). *Aquaculture*, 95:pp. 201-214.
- 30-Harris, J. and Bird, D. J., 2000. Modulation of the fish immune system by hormones. *Veterinary Immunology and Immunopathology*, 77:pp.163–176.
- 31-Heen, k., Monahan, R. L. and Utter, F., 1993, *Salmon aquaculture*. Fishing News Bokks.114P.
- 32-Hemre, G. I., Sandnes, K., Lie, Ø., Waagbø, R., 1995. Blood chemistry and organ nutrient composition in Atlantic salmon (*Salmo salar*) fed graded amounts of wheat starch. *Aquac. Nutr.* 1, 37– 42.
- 33-Henrique, M. M. F., Gomes, E. F., Gouilou-Coustans, M. F., Oliva-Teles, A. and Davies, S. J., 1998. Influence of supplementation of practical diets with vitamin C on growth and response to hypoxic stress of Sea bream, *Sparus Aurata*. *Aquaculture*, 161:pp. 415-426.

- 34- Jacob, R.A., 1995. The integrated antioxidant system. *Nutr Res*; 15:pp.755–66.
- 35- Kiron, V., Puangkaew, J., Ishizaka, K., Satoh, S. and Watanabe, T., 2004. Antioxidant status and nonspecific immune responses in rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) fed two levels of vitamin E along with three lipids sources. *Aquaculture*, 234:pp. 361–379.
- 36- Klinger, R. C., Blaer, V. S., Echevarria, C., 1996 . Effect of dietary lipid on the hematology of channel catfish, *Ictalurus punctatus*. *Aquacultur* 147,225-233.
- 37- Kolkovski, S., Czesny, S., Yackey, C., Moreau, R., Cihla, F., Mahan, D. and Dabrowski, K., 2000. The effect of vitamins C and E in (n-3) highly unsaturated fatty acids-enriched *Artemia nauplii* on growth, survival and stress resistance of fresh water walleye *Stizostedion vitreum* larvae. *Aquac. Nutr.* 6,;pp.199–206.
- 38- Kopp, R., Mares, j., Lang, T., Brabec, T. and Zikova, A., 2011. Assessment of ranges plasma indices in Rainbow trout reared under the conditions of intensive aquaculture. *ACTA*. Vol. LIX: pp.181-187.
- 39- Koshio, S., Lida, Y., Sakakura, Y., Tsukamoto, K., Kida, T. and dabrowski, K., 1997. The effect of vitamin C intake on growth, survival and schooling behavior of amphidromous fish, ayu (*Plecoglossus altivelis*). *Fish. Sci.*, 63:pp. 619-624.
- 40- Kubulay, A., Uluk, G., 2002. The effects of Acute stress on Rainbow trout: pp.249-244.
- 41- Kumar, R., S.C. Mukherjee, K.P. Prasad and A.K. Pal, 2006. Evaluation of *Bacillus subtilis* as a probiotic to Indian major carp *Labeo rohita* (Ham.). *Aquacult. Res.*, 37: 1215-1221.
- 42- Leatherland, J. F., 1987. Thyroid response to ovine thyrotropin challenge in cortisol-treated and dexamethasone- treated rainbow-trout, (*Salmo gairdneri*). *Comparative Biochemistry and Physiology*, 86B:pp. 383–388.
- 43- Li, X., Bickerdike, R., Nickell, D., Campbell, P., Dingwall, A. and Johnston, I., 2007. Investigation on the effects of Growth rate and dietary vitamin C on Skeletal Muscle collagen and Hydroxylsyl Pyridinoline Cross-Link concentration in Farmed Atlantic Salmon (*Salmo salar*). *J. Agric. Food Chem.* 55:pp.510-515.
- 44- Lin, Y. H., Shiau, S. Y., 2005. Dietary vitamin E requirement of grouper, (*Epinephelus malabaricus*) at two lipid levels and their effects on immune responses. *Aquaculture*, 248:pp. 235–244.
- 45- Lim, L. C., Dhert, P., Chew, W. Y., Dermaux, V., Nelis, H. and Sorgeloos, P., 2002. Enhancement of stress resistance of the guppy (*Poecilia reticulata*) through feeding with vitamin C supplement. *Journal of world aquaculture Society*, 33:pp.32-40.
- 46- Lovell, R. T., 1989. Vitamin C (ascorbic Acid) Nutrition and feeding of fish. An AVI book, Van Nostrand Reinhold Publication. pp.54-60.
- 47- Magnadottir, B. Gudmundsdottir, S., Gudmundsdottir, B.K., Sigurdsson, H. (2009). Natural antibodies of cod (*Gadus morhua* L.): Specificity, activity and affinity. *Comp. Biochem. Physiol. Part B*. 154:309-316.
- 48- Manera, M., and Britti, D., 2006. Assessment of Blood chemistry normal ranges in rainbow trout. *J. Fish. Bio.* 69:pp. 1435-1448.
- 49- Maule, A. G., Tripp, R. A., Kaattari, S. L. and Schreck, C. B., 1989. Stress alters the immune function and disease resistance in Chinook salmon (*Oncorhynchus tshawytsch*). *Journal of Endocrinology*, 120: pp. 135–142.
- 50- Mazur, A., of plasma iron incorporation into hepatic ferr *Chem.*, 135,595,1960.
- 51- Mc-Dowell, L. R., 1989. Vitamins in Animal Nutrition. Academic Press, San Diego, Brazil. 32P.

- 52- McDonald, D. G. and Milligan, C. L., 1992. Chemical properties of the blood. In: Hoar WS, Randall DJ, Farrell AP, editors. Fish Physiology, Vol XIIB. London: Academic Press: pp. 56-133.
- 53- Moksness, E., Kjorsvik, E. and Olsen, Y., 2004. Culture of cold-water marine fish. Blackwell, Oxford, 517P.
- 54- Mesa, M. B., Poe, T. P., Maule, A. G. and Shreck, C. B., 1998. Vulnerability to predation and physiological stress responses in juvenile chinook salmon (*Oncorhynchus tshawytscha*) experimentally infected with *Renibacterium salmoninarum*. *Can. Journal of Fish Aquaculture Society*. 7: pp. 1599-1606.
- 55- Meseguer, j; Esteban, M. and Mulero, V., 1998. Effects of in vitro addition of exogenous vitamins C and E on gilthead seabream (*Sparus aurata* L.) phagocytes. *Veterinary Immunology and Immunopathology. Elsevier*: pp. 185-199.
- 56- Montero, D., Tort, L., Izquierdo, M. S., Robaina, L., Vergara, J. M., 1998. Depletion of serum alternative complement pathway activity in gilthead seabream caused by α -tocopherol and n-3 HUFA dietary deficiencies. *Fish Physiol. Biochem*. 18: pp.399–407.
- 57- Montero, D., Marrero, M., Izquierdo, M. S., Robaina, L., Vergara, J. M. and Tort, L., 1999. Effect of vitamin E and C dietary supplementation on some immune parameters of gilthead seabream (*Sparus aurata*) juveniles subjected to crowding stress. *Aquaculture*, 171: pp. 269–275.
- 58- Moreau, R., Dabrowski, K., Czesny, S. and Cihla, F., 1999. Vitamin C and Vitamin E interaction in juvenile lake sturgeon (*Acipenser fulvescens* R.) a fish able to synthesize ascorbic acid. *J. Appl. Ichthyol*. 15: pp. 250–257.
- 59- (National Research Council). 1993. Nutrient requirements of fish. National Academy Press, Washington, Dc, USA, P114.
- 60- Nelson, D. L. and Cox, M. M., 2005. Lehninger's Principles of Biochemistry. 4th Edn. Freeman, W. H. and Company, New York.
- 61- Nickell, D. C., Bromage, N. R., 1998. The effect of timing and duration of feeding astaxanthin on the development and variation of fillet color and efficiency of pigmentation in rainbow trout. *Aquaculture*. VOL.169 no.3-4: pp. 233-246.
- 62- Noeske, T. and Spieller, R., 1993. Photoperiod and diet variation of serum cortisol, thyroxine and protein in goldfish (*Carassius auratus* L). *Journal Fish Biology*. 23: pp. 705-710.
- 63- Oikawa, D., Ando, H., Mishiro, k. and furuse, M., 2008. Dietary Hydroxyproline Improves Collagen Contents of the Fillet in Tiger Puffer (*Takifugu rubripes*). *Journal of fisheries International*, 3(2): pp. 49-51.
- 64- Ortuño, J., Esteban, M. and Meseguer, A., 2003. The effect of dietary intake of vitamins C and E on the stress response of gilthead seabream (*Sparus aurata* L.). *Fish Shellfish Immunol*, 14: pp. 145–156.
- 65- Pickering, A. D. and Pottinger, T. G., 1985. Cortisol can increase the susceptibility of brown trout (*Salmo trutta* L.) to disease without reducing the white blood cell count. *Journal of Fish Biology*, 27: pp. 611–619.
- 66- Pickova, J., Kissling, A., Petterson, A. and Dutta, P. C., 1999. Fatty acid and carotenoid composition of eggs from two nonanadromous Atlantic salmon stocks of cultured and wild origin. *Fish Physiol. Biochem*. 21: pp. 147-156.
- 67- Pottinger, T. G., Yeomans, W. E. and Carrick, T. R., 1999. Plasma cortisol and 17 β -oestradiol levels in roach exposed to acute and chronic stress. *Journal Fish Biology*. 54: pp. 525-532.

- 68- Pottinger, T. G., 1998. Changes in blood cortisol, glucose and lactate in carp retained in anglerkeepnets. *Journal of Fish Biology*, 53: pp. 728-742.
- 69- Puangkaew, J., Kiron, V., Somamoto, T., Okamoto, N., Satoh, S., Takeuchi, T. and Watanabe, T., 2004. Non-specific immune response of rainbow trout (*Onchorhynchus mykiss*) in relation to different status of vitamin E and highly unsaturated fatty acids. *Fish Shellfish Immunol*, 16: pp. 25–39.
- 70- Raa, J., 2000. The use of immune-stimulants in fish and shellfish feeds. Fifth International Symposium on Aquaculture Nutrition. 19-22 November. Merida, Yucatan, Mexico.
- 71- Rosenlund, G., 2003. L'importanza degli alimenti destinati ai pesci riproduttori per la produzione di uova ed avannotti. *Skretting Informa* 1: pp. 8-12.
- 72- Sandnes, K., Hansen, T., Killie, J.E.A. and Waagbo R. Ascorbic -2- sulfate as a dietary vitamin C source for Atlantic salmon (*salmo salar*): I. growth bioactivity. Haematology and humoral immune response, *Fish physiol. Bio* 8, 419, 1990.
- 73- Scaife, J. R., Onibi, G. E., Murray, I., Fletcher, T. C. and Houlihan, D. F., 2000. Influence of α -tocopherol acetate on the short-and long-term storage properties of fillets from Atlantic salmon *Salmo salar* fed a high lipid diet. *Aquaculture Nutrition*, 6: pp. 65-71.
- 74- Shalaby, A.M., Khattab, Y.A., Abdel Rahman, A.M., 2006. Effects of garlic (*Allium sativum*) and chloramphenicol on growth performance, physiological parameters and survival of Nile (*Oreochromis niloticus*). *J. Venom. Anim. Toxins Trop. Dis.* 12, 172–201.
- 75- Shiau, S. Y. and Hsu, C. Y., 1999. Quantification of vitamin C requirement for juvenile hybrid tilapia, *Oreochromis notilicus* \times *Oreochromis aureus* with L-ascorbyl-2 monophosphate-Na and L-ascorbyl-2-monophosphate-mg. *Aquaculture*, 175: pp. 317-325.
- 76- Srivastava, A., Stoss, J. and Hamre, K., 2011. A study on enrichment of the rotifer *Branchionus* "Cayman" with iodine and selected vitamins. *Aquaculture*, 319: pp. 430-438.
- 77- Sotoudeh, E., Abedian kenari, A. and Habibi., 2010. Growth response, body composition and fatty acid profile of Caspian brown trout (*Salmo trutta Caspius*) juvenile fed diets containing different levels of soybean phosphatidylcholine. *Aquacult Int.* DOI. 184P.
- 78- Sunyer, J. O. and Tort, L., 1995. Natural hemolytic and bactericidal activities of sea bream *Sparus aurata* serum affected by the alternative complement pathway. *Veterinary Immunology and Immunopathology*, 45: pp. 333–345.
- 79- Svobodova, Z., Pravda, D., Palackova, J. 1991. Unified methods of hematological examination of fish. Research institute of fish culture and hydrobiology, Vodnany, Edition methods. 31P.
- 80- Tengerdy, R. P., 1989. Vitamin E, immune response and disease resistance. *Ann. N. Y. Acad. Sci.* 570: pp. 335–344.
- 81- Tolbert, B. M., 1979. Ascorbic acid metabolism and physiological function. *Int. J. Eit. Nutr. Res.*, 19: pp. 127-142.
- 82- Tort, L., Rotllant, J., Liarte, C., Acerete, L., Hernández, A., Ceulemans, S., Coutteau, P. and Padros, F., 2004. Effects of temperature decrease on feeding rates, immune indicators and histopathological changes of gilthead sea bream *Sparus aurata* fed with an experimental diet. *Aquaculture*, 229: pp. 55–65.

- 83- Trenzado, C. E., Morales, A. E, de la Higuera, M., 2007. Physiological effects of crowding in rainbow trout, *Oncorhynchus mykiss*, selected for low and high stress responsiveness. *Aquaculture*, 258: pp. 583–593.
- 84- Waagbo, R., Gillette, J., Nilsen, E. R, Sandnes, K., 1993. Dietary vitamin C immunity and disease resistance in Atlantic salmon (*Salmo salar*). *Journal of physiology and Biochemistry* 13, 61-73.
- 85- Wang, C., Xie, S., Zheng, K., Zhu, X., Lie, W., Yang, Y., and Liu, J., 2005. Effects of live food and formulated diets on survival, growth and protein content of first- feeding larvae of *Pelteobagrus fulvidraco*. *Journal of Appl. Ichthyol*, 21: pp. 210-214.
- 86- Wedemeyer, G.A., 1997. Effects of rearing conditions on the health and physiological quality of fish in intensive culture. *Fish stress and health in Aquaculture*. Cambridge University Press, pp. 35-71.
- 87- Wedemeyer, G.A., Barton, B.A., and McLeay, D.J., 1990. Stress and acclimation. In *Methods for Fish Biology* (Scheck, C. B. and Moyle, P.B., Eds): pp. 451-490.
- 88- Webster, C. D., 2002. Nutrient requirements and feeding of Finfish for Aquaculture. *Nature*. 418P.
- 89- Wilson, R. P., 1973. Absence of ascorbic acid synthesis in channel catfish *Ictalurus punctatus* and blue catfish *Ictalurus frucatus*. *Comp. Biochem. Physiol.*, 468: pp. 635-638.
- 90- Xie, Z. and Niu, C., 2006. Dietary ascorbic acid requirement of juvenile ayu (*Plecoglossus altivelis*). *Aquaculture Nutrition*, 12: pp. 151-156.

Abstract

This study was conducted to assay the effects of different levels of dietary vitamins C and E on growth indices and survival and resistance against thermal stress of rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) in pond culture of Marzan abad from December 2011 to February 2011. Seven diets were supplemented. 300 fish with the average weight of 17 g were introduced to ponds for 60 days. The results showed that the highest and the lowest weight gain were in fish fed with diet containing 50 mg/kg vitamin C and E and 0 mg/kg vitamin C and E (control), respectively. The highest and the lowest Feed Conversion Ratio (FCR) were measured in control and diet 50 mg/kg vitamin C and E. There is a significant difference in their treatments ($P < 0.05$). Also, the lowest and highest amount of Weight Gain (WG) were observed in (E) treatment with 165.04% and 117.5% in control, the highest and lowest Specific Growth Rate (SGR), Protein Efficiency Ratio (PER), Condition Factor (CF) was found in control and treatment 50 mg/kg vitamin C and E, respectively ($P < 0.05$). In conclusion vitamin C and E have an important role in enhancement of growth performance and feed efficiency of rainbow trout. The highest red blood cells were found in combined treatments and which the vitamin C was added. The highest RBC were found in E treatment ($1.1 \times 10^4 / \text{mm}^3$) and the lowest one in control ($P < 0.05$). Counting white blood cells also confirmed highest quantity in combined treatments with ($69.83 \times 10^4 / \text{mm}^3$) and the lowest one ($28.83 \times 10^4 / \text{mm}^3$) in control. In conclusion these vitamins have a significant role in blood characteristics. Meantime, the resistance against thermal stress was measured at the end of 60 days by facing fishes into 5 centigrade warmer water so concentration of Cortisol and Glucose measured for this reason. The lowest cortisol amount was measured in E treatment with 188.74 ng/ml and the highest was found in control ($P < 0.05$). There was a significant difference in blood glucose concentration of fishes in F treatment with (78.66 mg/dl) and control with 136 mg/dl as a highest one ($P < 0.05$).

Keywords: FCR, vitamin C and E, Growth Indices



**ISLAMIC AZAD UNIVERSITY
SCIENCE AND RESEARCH BRANCH**

Faculty of Agriculture and Natural Resources-Department of Fisheries

Ph.D Thesis Fisheries

Subject:

Merging effects of vitamin E and C on biological factors, blood characteristics and resistance against thermal stress in rain bow trout (*Onchorhyncus mykiss*)

Thesis Advisors:

A. Matinfar Ph.D.

M. Shamsaei Ph.D.

Consulting Advisor:

M. Soltani Ph.D.

By:

Arghavan Miar Abbas Kiani

February 2013